

وزارت جهاد كشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج كشاورزی  
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

عنوان:  
ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید حوزه  
جنوبی دریای خزر با استفاده از  
روش مولکولی

مجری:  
حسین علی عبدالحی

شماره ثبت  
۸۹/۹۳۲

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

عنوان پروژه / طرح : ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از روش مولکولی  
شماره مصوب : ۴۰۱۹-۲۰۰۰۰۰-۰۳-۸۵۰۱۶  
نام و نام خانوادگی نگارنده / نگارندگان : حسین علی عبدالحی  
نام و نام خانوادگی مجری مسئول ( اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد ) : -  
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : حسین عبدالحی  
نام و نام خانوادگی همکاران : فرامرز لالویی - محمد جواد تقوی - محمد حسن زاده صابر - محبوبه نیرانی  
نام و نام خانوادگی مشاوران : سهراب رضوانی گیل کلایی  
محل اجرا : استان تهران  
تاریخ شروع : ۱۳۸۵ / ۱ / ۱  
مدت اجرا : ۳ سال  
ناشر : مؤسسه تحقیقات شیلات ایران  
شمارگان ( تیراژ ) : ۲۰ نسخه  
تاریخ انتشار : سال ۱۳۸۹  
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

## «سوابق طرح یا پروژه و مجری»

پروژه : ساختار ژنتیک جمعیت ماهی سفید حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از روش

مولکولی

کد مصوب : ۸۵۰۱۶-۰۳-۲۰۰۰۰۰-۰۱۹-۴

شماره ثبت (فروست) : ۸۹/۹۳۲ تاریخ : ۱۳۸۹/۸/۱۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای حسین علی عبدالحی دارای می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان مورد

ارزیابی و با نمره ۱۷/۵ و رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

☐ ایستگاه

☐ مرکز

☐ پژوهشکده

☒ ستاد

با سمت کارشناس بخش مشغول بوده است.

## به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده.....		۱
۱- مقدمه.....		۳
۲- بررسی جمعیت ماهی سفید با استفاده از مولکول mt DNA به روش RFLP.....		۷
۲-۱- روش کار.....		۹
۲-۲- نتایج.....		۱۳
۲-۳- بحث و نتیجه گیری.....		۱۸
۳- بررسی جمعیت ماهی سفید با استفاده از روش ریز ماهواره ها.....		۲۰
۳-۱- روش کار.....		۲۸
۳-۲- نتایج.....		۳۳
۳-۳- بحث.....		۵۲
۴- نتیجه گیری نهایی.....		۵۷
پیشنهادها.....		۵۸
منابع.....		۵۹
چکیده انگلیسی.....		۶۴

## چکیده

### ۱- بررسی جمعیت ماهی سفید با استفاده از مولکول mt DNA به روش RFLP

در این بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) دریای خزر در چهار رودخانه سفیدرود، شیروود، تجن و لمیر با روش RCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۲۹۴ نمونه (۱۰۰ نمونه از سفیدرود، ۴۸ نمونه از شیروود، ۴۸ نمونه از تجن و ۹۸ نمونه از رودخانه لمیر) جمع آوری و پس از استخراج DNA با روش فنل کلروفورم، ژن ND5/6 با طول ۲۵۰۰ bp با استفاده از PCR تکثیر شد و با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مورد مشاهده قرار گرفت. سپس محصول PCR با ۲۰ آنزیم برشگر آندونوکلاز هضم گردید. از بین آنزیم‌های فوق ۴ آنزیم *Tas I*، *Hinc II*، *Hinf I*، *Hae II* تنوع چندشکلی را نشان دادند. جهت مشاهده هضم آنزیمی از الکتروفورز عمودی ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد استفاده شد و سپس با رنگ آمیزی نیترا ت نقره برشهای آنزیمی حاصله مورد مطالعه قرار گرفت. در کل ۲۰ هاپلوتیپ در ۴ رودخانه مورد بررسی بدست آمد که بیشترین فراوانی بترتیب مربوط به هاپلوتیپ های AAAA و BAAA بودند. این روش در عین نشان دادن تنوع ژنتیکی در نمونه های مورد بررسی اما قادر به تفکیک جمعیت های مختلف نبود.

### ۲- ریزماهواره ها (Microsatellite)

در روش ریزماهواره ای کل ژنوم هسته های موجود در مورد بررسی قرار میدهد و معمولاً الگوهای چند شکلی بیشتری از آن بروز میکند. این روش برای تکمیل تحقیقات جمعیت شناسی ماهی سفید بکار گرفته شد. در این روش ۳۰ نمونه از هر رودخانه مورد بررسی قرار گرفت. ۳۰ جفت پرایمر مورد استفاده قرار گرفت که ۸ جفت از پرایمرها تنوع نشان دادند.

در مطالعه حاضر بیشترین هتروزیگوسیتی در رودخانه های شیروود (۰/۹۷) و کمترین آن در رودخانه تجن (۰/۱۷) مشاهده شده است. ضمن اینکه هتروزیگوسیتی در کل مناطق بین ۰/۱۳ تا ۰/۹۸ برای جایگاه آلل های مختلف نوسان داشته است.

با توجه به بررسی انجام شده تعادل هاردی - واینبرگ نشان می دهد به جز جایگاه ۳ (SPY6) در دیگر جایگاهها اختلاف مشاهده شده در بین نمونه ها معنی دار بوده است ( $P \leq 0.001$ ) و معنی آن این است که جمعیت از تعادل ژنتیکی خارج شده است.

در این بررسی بیشترین مقدار  $F_{st}$  بین نمونه های رودخانه لمیر با سفیدرود (۰/۰۸) و کمترین مقدار بین نمونه های رودخانه سفیدرود با تجن (۰/۰۰۸) بوده است. علاوه بر این بیشترین مقدار  $R_{st}$  بین نمونه های رودخانه شیرو و سفیدرود (۰/۳۴) و کمترین آن بین نمونه های رودخانه سفیدرود با تجن (۰/۰۰۱) مشاهده شده است. در بررسی حاضر بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به نمونه های رودخانه شیرو و با تجن (۰/۰۷) و کمترین فاصله بین نمونه های سفیدرود با تجن بوده است. ضمن اینکه بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه های رودخانه تجن با سفیدرود و کمترین شباهت بین رودخانه شیرو و با تجن بوده است.

## ۱- مقدمه

ماهیان استخوانی دریای خزر به عنوان گروهی از آبزیان بسیار اقتصادی دریای خزر محسوب می شوند که بعد از ماهیان خاویاری در رده دوم درآمدزایی قرار داشته البته امروزه با توجه به کاهش ذخائر ماهیان خاویاری میتوان گفت در رده اول قرار دارد ضمن آنکه در زمینه اشتغال و کارآفرینی به عنوان اولین گروه و بالاترین رتبه به شمار می آید. میزان کل ماهیان استخوانی صید شده در دریای خزر به ۲۳۵۳۸ تن می رسد (Abdolmaleki & Ghaninezhad, 2007). سرآمد ماهیان استخوانی دریای خزر که بالاترین مقدار و بیشترین ارزش اقتصادی را به خود اختصاص داده است ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) می باشد که میزان برداشت سالیانه آن به ۱۷۱۹۶ تن، از کل ۲۳۵۳۸ تن ماهیان استخوانی می رسد (Abdolmaleki & Ghaninezhad, 2007).

ماهی سفید در بین ذخایر ماهیان استخوانی یکی از گونه های با ارزش و اقتصادی در حوضه جنوبی دریای خزر است که دو نژاد از ماهی سفید شناخته شده که شامل مهاجرین پائیزه و بهاره می باشد (Chakmehdouz Ghasemi et al., 2009). نژاد پائیزه به علت از بین رفتن بسترهای طبیعی تخم ریزی، صید بی رویه و فقدان تکثیر مصنوعی آن حداقل در حوضه جنوبی صید آن گزارش نگردیده است. هرچند که در سواحل گیلان (مرداب انزلی) بندرت صید می گردد. لذا نژاد بهاره است که ذخایر حوضه جنوب را تشکیل می دهد. اما این ذخایر نیز بدلائل متعددی از جمله تغییر آب سطح دریای خزر، ماهیگیری غیرمسئولانه، آلودگی های صنعتی و شهری، موانع مکانیکی (پلها)، تغییرات زیست محیطی محلهای مهاجرت طبیعی و کاهش دبی آب رودخانه ها در فصل مهاجرت تکثیر طبیعی بشدت کاهش پیدا کرده است. با توجه به اینکه بازسازی و احیاء رودخانه های حوضه جنوبی مشکل و گاه غیرممکن است، در حال حاضر تنها شیوه احیاء ذخایر ماهی سفید در حوضه جنوبی دریای خزر از طریق تکثیر مصنوعی و رهاسازی ماهی سفید است.

## رده بندی ماهی سفید

Taxonomy and characteristics of Mahisefid :

Kingdom: Animal  
Phylum: Vertebrata  
Super class: Pisces  
Class: Osteichthyes  
Subclass: Actinopterygii  
Order: Cypriniformes

Family: Cyprinidae  
Genus: *Rutilus*  
Species: *Rutilus frisii*  
Subspecies: *Rutilus frisii kutum* (Kamenskii 1901)  
Persian name: Mahi Sefid  
English name: Kutum  
Russian name: Kutuma

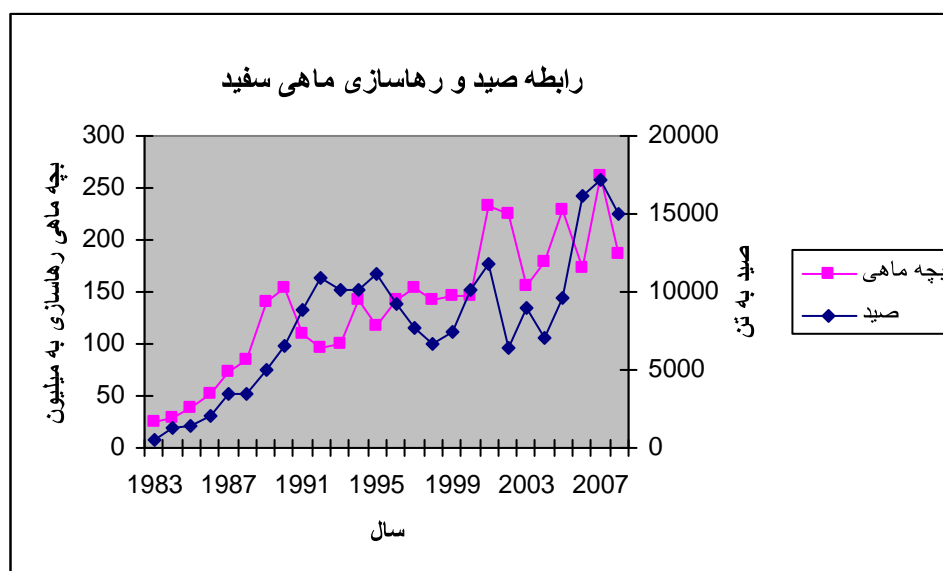
پراکنش عمده ماهی سفید در سواحل دریای خزر از رودخانه ترک در قسمت شمالی دریای خزر تا سواحل قسمت جنوبی دریای خزر و بخصوص در مناطق غربی و شرقی انزلی می باشد و در قسمت شمالی دریا و به ویژه رودخانه های ولگا و اورال بندرت مشاهده می شود. این ماهی در سواحل ایران به رودخانه های دیناچال، حویق، لمیر، چلون، شیرود، شفارود رودخانه های منتهی به تالاب انزلی، سفیدرود، شلمانرود، خشک رود، چشمه کیله (تنکابن)، چالوس، تجن، بابلرود، سرخرود و گرگانرود جهت تولید مثل مهاجرت می نماید. بنابراین می توان اینگونه نتیجه گرفت که ۹۰٪ ذخایر این ماهی بومی سواحل ایران است (قلی اف، ۱۹۹۷). این ماهی در دریای خزر دارای دو نژاد بهاره و پاییزه می باشد (رضوی صیاد، ۱۳۷۲ و ۱۳۷۸). بیش از ۹۸ درصد ذخایر ماهی سفید دریای خزر را، جمعیت فرم بهاره تشکیل می دهد (رضوی صیاد، ۱۳۷۲ و ۱۳۷۸). با توجه به از بین رفتن بسیاری از مسیرهای مهاجرت طبیعی، آلودگی ها، تکثیر طبیعی این ماهی به طور عمده ای کاهش پیدا کرده و تکثیر مصنوعی آن از سالها پیش آغاز گردیده است (عبدالحی، ۱۳۷۷ و ۱۳۸۴).

جدول ۱- میزان رهاسازی و صید ماهی سفید

سال	بچه ماهی رهاسازی شده	میزان صید تن
1357	11857.4	897.7
1360	405.0	100
1361	2809.1	356.6
1362	25335.4	563
1363	28342.3	1298.7
1364	38000.0	1398.6
1368	140158.0	5000
1369	154268.0	6500
1370	109843.0	8855
1372	100047.0	10086
1373	142733.0	10075
1374	125119.0	11175
1375	142091.9	9222



10120	147437.0	1379
11735	233018.4	1380
6417	225198.3	1381
8984	155050.2	1382
7036	179000	1383
9631	229000	1384
16117	174000	1385
17,196	262000	1386
14,835	187100	1387



شکل ۲: رابطه بین رهاسازی و صید ماهی سفید در جنوب دریای خزر

Coad (۲۰۰۰) این گونه را در ردیف ۴ گونه در خطر ایران قرار داد. عدم مدیریت صحیح و اتکاء دراز مدت ذخایر ماهی سفید بر تکثیر مصنوعی با توجه غالبیت تدریجی و کامل نژادهای حاصل از تکثیر مصنوعی (۱۰۰-۹۰٪) در سواحل جنوبی دریای خزر مطمئناً تأثیرات سوئی همچون کاهش تنوع ژنتیکی ماهی سفید بدلیل آمیزشهای خویشاوندی را در پی خواهد داشت. بنابراین شناخت جمعیت‌های این ماهی از مهمترین عوامل در تکثیر مصنوعی این گونه است. کاهش ذخایر آبزیان در اکثر نقاط دنیا سبب گردید که توجه محققین زیادی به روشهای دقیق بیولوژی از جمله روشهای مولکولی جهت مدیریت ذخایر آبزیان جلب شود. شناسایی گونه‌ها، جمعیت‌ها و نژادها در برنامه‌های بهره برداری از ذخایر آبزیان دریائی، برنامه‌های آبرزی پروری و اصلاح نژاد

دارای اهمیت زیادی می باشد (Li *et al.*, 2003). امروزه تمایز جمعیت های متفاوت آبزیان به سه روش متداول مانند استفاده از مشخصه های مرفولوژی، تنوع آلوزایم ها و تفاوت در توالی DNA انجام می گیرد. روش استفاده از تفاوت در توالی های DNA از جمله دقیق ترین روش در طبقه بندی موجودات بوده و بدور از هر گونه اشتباه می باشد. در اکثر موجودات از داده های مربوط به توالی DNA برای تعیین روابط تکاملی استفاده می شود و از آنجائیکه چنین داده هایی کمتر تحت تاثیر انتخاب قرار می گیرند، بهتر می توانند روابط فیلوژنی واقعی را نمایان سازند (Hansen *et al.*, 2000).

در ابتدا ارزیابی ساختار ذخایر، تشخیص گونه ها، جمعیتها، نژادها با استفاده از صفات مرفومتريک و مریستیک مثل طول بدن، تعداد فلس روی خط جانبی، تگهای مصنوعی صورت می گرفت. اما با توجه به حساسیت بالای صفات مرفومتريک و مریستیک به تغییرات محیطی و اثرات منفی دستکاری در نشانه گذاری بر سلامت و بقای ماهیان، از طرفی محدود بودن تفسیر داده های نشانه گذاری به زمان جمع آوری آنها (Adams, 2003)، پیشرفت علم استفاده از مارکرهای مولکولی مثل Microsatellite، RAPD<sup>1</sup>، AFLP<sup>2</sup>، RFLP<sup>3</sup>، Allozyme که متاثر از فاکتورهای محیطی نمی باشد را جهت شناسایی ساختار ژنتیکی ذخایر امکان پذیر کرده است (Rayman, 1981) و تنها کار مولکولی در ایران روی این گونه معرفی نشانگر ژنتیکی برای شناسایی آن بوده است (رضوانی گیل کلایی ۱۳۸۵). با توجه به وجود رودخانه های مختلف که برای تکثیر ماهی سفید وجود دارد احتمالاً در هریک از این رودخانه ها دارای جمعیت های متفاوت می باشد که شناسایی جمعیتها برای تکثیر و بازسازی تمامی ذخایر ژنتیکی ضروری می باشد.

## ۱-۱- فرضیه ها و هدف از انجام این تحقیق

تعیین تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی در ۴ رودخانه سفیدرود، شیرود، تجن و لمیر

تعیین فاصله ژنتیکی و فراوانی آللی بین مناطق نمونه برداری

شناخت جمعیت های احتمالی ماهی سفید در مناطق نمونه برداری شده

<sup>1</sup>- Random Amplification Polymorphic DNA

<sup>2</sup>- Amplified Fragment Length Polymorphism

<sup>3</sup>-Restriction Fragment length Polymorphism

ماهی سفید هر منطقه دارای تنوع ژنتیکی متفاوتی بوده و هر منطقه نسبت به منطقه دیگر تغییر می کند. در این مطالعه از دو روش پلی مورفیسم قطعات محدود (RFLP) و ریزماهواره ها (Microsatellite) استفاده شده است. روش ریزماهواره ها (Microsatellite) با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده کارائی لازم برای جدا سازی جمعیت های احتمالی ماهی سفید را دارد.

## ۲- بررسی جمعیت ماهی سفید با استفاده از مولکول mt DNA به روش RFLP

### مروری بر مطالعات انجام شده

امروزه روش های متفاوتی در بررسی تنوع ژنتیکی وجود دارد. پیشرفت بیولوژی مولکولی بر مبنای DNA، نشانگرهای مولکولی از جمله RFLP، AFLP، Minisatellite، Microsatellite، مارکرهای متکی بر PCR هستند که انقلابی در پیشبرد مطالعات تنوع ژنتیکی ایجاد کردند.

RFLP از سال ۱۹۸۷ بطور گسترده ای بر روی انواع DNA توسط شرکت های ایالات متحده آمریکا مورد استفاده قرار گرفت. این آنالیز قدرت تشخیص بسیار قوی داشته و احتمال اشتباه در آن بسیار کم است. از مزیت های مهم این تکنیک دقت زیاد، سرعت بالا و قدرت تشخیص آن می باشد که باعث گردیده باب نوینی در علم ژنتیک گشوده گردد. RFLP اولین بار در سال ۱۹۷۴ به عنوان مارکر ژنتیکی توسط Grodzicher و همکاران برای تعیین جهش در ویروسها بکار گرفته شد.

این روش ناشی از توانائی یک آنزیم محدود کننده در بریدن جایگاه های اختصاصی از توالی نوکلئوتیدی در DNA است اگر جهشی در جایگاه برش آنزیم واقع شود. جایگاه اختصاصی نسبت به عمل آنزیم پوشیده می شود و در عمل آنزیم الگوی جدید از قطعات را ایجاد می کند. در این صورت محل شناسایی در توالی DNA چنان تغییر یافته است که برش آن توسط آن آنزیم اختصاصی ممکن نیست. این محلها را تحت عنوان پلی مورفیسم قطعات محدود RFLP نامیده اند.

مطالعه بر روی mtDNA به عنوان یک ابزار در تعیین جمعیت ها از دهه ۱۹۸۰ تاکنون استفاده می شود با استفاده از این روش تاکنون توانسته اند جمعیت های مختلفی را در ماهیان استخوانی مشخص کنند. اگرچه امروزه روش های متعددی بر پایه ژنوم هسته ای ارائه شده است. اما هنوز بهترین روش برای تعیین روابط فیلوژنتیکی می باشد و در

مطالعات جمعیتی اگرچه نسبت به نشانگرهای Microsatellite و RAPD در برآورد جریان ژنی و تنوع ژنتیکی ضعیف است ولی در تعیین اختلاف بین جمعیت‌ها هنوز روش قوی می‌باشد. در این تحقیق با توجه به اینکه شناختی در مورد ژنوم هسته‌ای این گونه (ماهی سفید) وجود ندارد. با استفاده از مقالات چاپ شده درخصوص گونه‌های نزدیک راهی برای پیشبرد این تحقیق انتخاب شد که در این خصوص استفاده از روشهای پیشرفته مانند RFLP و Microsatellite میسر گردید.

در ایران نیز مطالعاتی در خصوص بررسی جمعیت‌های کپورماهیان انجام شده است. مقایسه خصوصیات مرفومتريک و الکترو فورتیک ماهی کپور معمولی در منابع آبی شمال ایران، نشان داده که در کپور ماهیان چند شکلی و تنوع شدید در ترانسفرین مشاهده می‌شود (عطائی، ف، ۱۳۸۱؛ لالویی، ف، ۱۳۸۲). رضوانی و همکاران (۱۳۸۵) تنوع ژنتیکی ۵ گونه از کپور ماهیان (ماهی سفید، سس، ماش، سیم و کلمه) به روش RFLP مورد بررسی قرار داده که ۵ آنزیم از ۱۳ آنزیم مورد استفاده الگوهای چند شکلی را برای هر یک از گونه‌ها نشان داده است.

در بررسی دیگر جمعیت ماهی کلمه دریای خزر با استفاده از آنالیز RFLP مورد مطالعه قرار گرفته است (Rezvani Gilkolahi *et al.*, 2006) محصول PCR نمونه‌های کلمه جمع آوری شده از دو منطقه بندر انزلی و بندر ترکمن با ۱۳ آنزیم اندونوکلاز مورد هضم آنزیمی قرار گرفت که در مجموع ۴ هاپلوتیپ متفاوت شناسایی گردید (Rezvani Gilkolahi *et al.*, 2006) آنالیز شبیه سازی با هزار بار تکرار، تفاوت معنی داری بین هاپلوتیپهای مناطق مختلف نشان نداده است ( $p \geq 0.05$ ).

عطائی (۱۳۸۱) تنوع ژنتیکی تاس ماهی ایرانی در رودخانه سفید رود، جنوب شرقی و غربی دریای خزر را با استفاده از PCR-RFLP مورد بررسی قرار داد. نتایج مطالعات فوق مشخص کرد که جمعیت‌های مورد مطالعه همگن بودند.

علاوه بر مطالعات فوق، جمعیت سس ماهی بزرگ سر، نیز به روش PCR-RFLP در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر انجام شد که نتایج حاصله پدیده پلی مورفیسم را در نمونه‌های مورد بررسی نشان نداد (لالویی و همکاران، ۱۳۸۲)، همچنین مطالعات متعددی با روش RFLP در مورد کیلکا ماهیان (لالوئی و همکاران، ۱۳۸۵)، تاسماهی روسی (Rezvani Gilkolahi, 2000) انجام شد.

## ۱-۲- روش کار

### ۱-۲-۱- مواد و تجهیزات مورد نیاز در استفاده از مولکول mtDNA به روش PCR-RFLP

فنل متعادل pH=8، کلروفرم، ایزوامیل الکل، بافر STE (pH 8, 100mM NaCl, 20mM Tris-HCl, EDTA 10mM)، اتانول مطلق، اتانول ۷۰ درصد، پروتئیناز K (Cinnagen 20 mg/ml)، محلول SDS ۲۰ درصد (سدیم دودسیل سولفات)، بافر TAE با غلظت ۱۰X (تریس استات) آگاروز، بافر سنگین کننده Loading buffer، میکروپیست، سر سمپلرهای ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، اتانل ۹۶ درصد، تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری، آب مقطر تزریقی، اتیدیوم بروماید. آزمایشات PCR:

- ۱- آنزیم DNA پلی مرز (Taq DNA polymerase): از شرکت های Eppendorf و Cinnagene.
- ۲- MgCl<sub>2</sub>، از شرکت Eppendorf (25 mM) و Cinnagene (50 mM).
- ۳- بافر (PCR buffer) در غلظت ۱۰X از شرکت های Eppendorf و Cinnagene.
- ۴- dNTPs از دو شرکت Cinnagene (10 mM) و Pharmacia (20 mM).
- ۵- آغازگر Primer: پرایمرهای اختصاصی ناحیه ND5/6 mtDNA، ساخت شرکت MBI آلمان 5 AAT ND5-  
3 TAC TCT TGG AGT TTC TTA AGT  
3 TCA ATA TTC TTT TGG CGA CAA TAA ND6-5
- ۶- آب مقطر استریل دوبار تقطیر
- ۷- DNA ژنومی استخراج شده
- ۸- میکروتیوپ های ۲/ و ۱/۵ میلی لیتر استریل

## هضم آنزیمی

- ۱- آنزیم های برشگر ساخت شرکت های Fermentase و Amersham Pharmacia, Cinnagene
  - ۲- محصول PCR
  - ۳- تیوپ ۰/۵ میلی لیتر
- الکتروفورز هضم آنزیمی و رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید با استفاده از نیترات نقره
- محلول پلی اکریل آمید ۳۰ درصد (۲۹ گرم اکریل آمید + ۱ گرم بیس اکریل آمید)، بافر (900mM Tris; 1.1 M) TBE Borate; 25 mM EDTA; pH 8.3 با غلظت ۱۰X، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد، TEMED، بافر سنگین کننده،

مارکر ۱۰۰bpleader، بافر A (اسیداستیک ۰/۵ درصد و الکل ۱۰ درصد)، بافر B (نترات نقره های ۰/۱ درصد)، بافر C (فرمالدئید ۰/۱۵ درصد، NaBH<sub>4</sub> ۰/۱ درصد، NaOH ۴/۵ درصد).

### وسایل و تجهیزات مورد نیاز

میکروسانتریفوژ (ساخت شرکت Eppendorf مدل 5415 D)، ترمومیکسر (ساخت شرکت Eppendorf مدل 54136)، تیوپ و رک، هود لامینار مجهز به لامپ UV (ساخت شرکت Jencons Millennium)، شیکر (Akhtarian، مدل 05-2040) نمونه بردارها و نوک های مربوط به آنها با توانایی برداشتن نمونه با حجم ۰/۱ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر و دقت ۱ و ۰/۱ میکرولیتر (Eppendorf)، دستکش یکبار مصرف، یخچال ۴°C، فریزر ۲۰°C، فریزر ۸۰-، دستگاه UV ترانس ایلومیناتور، الکتروفورز افقی و منبع تأمین کننده جریان الکتریسته (Amersham Pharmacia)، دستگاه اسپکتوفتومتری (CECIL، مدل CE2040). دستگاه ترموسایکلر (Amersham Pharmacia مدل TC341). الکتروفورز عمودی (Hoefer، مدل SE61152)، مولد جریان برق (Amersham pharmacia) دستگاه مستند سازی ژل (Vilber Lourmat) همراه با برنامه های نرم افزاری Biogene، Biocape.

### نمونه برداری

نمونه های مورد استفاده در این بررسی از رودخانه های لمیر، سفیدرود، تجن و شیرود و ماهیان تکثیر شده در سال ۱۳۸۵ بودند. رودخانه های فوق به دلیل اهمیت رهاسازی و فاصله انتخاب شدند. رودخانه شیرود در مازندران و رودخانه سفید رود در گیلان بیشترین میزان تخم استحصال را دارند. رودخانه لمیر در غربی ترین نقطه گیلان و رودخانه تجن در شرقی ترین نقطه مازندران قرار دارند. مولدین در رودخانه های لمیر و سفیدرود با روش شیل، در رودخانه تجن با دام و در رودخانه شیر رود با ماشک صید میشوند. جهت انجام نمونه برداری حدود ۲ gr از بافت نرم باله از انتهای باله دمی و باله پشتی ماهی سفید جدا و در الکل اتانول ۹۶٪ فیکس گردید. و برای انجام آزمایشات به انستیتو تحقیقات بین الملل ماهیان خاویاری (واقع در رشت) منتقل گردید. در این تحقیق بر اساس جدول ۲ نمونه ها مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA با روش فنل کلروفرم انجام شد و به منظور مشخص شدن کیفیت و کمیت DNA از روشهای اسپکتوفتومتری و الکتروفورز استفاده گردید.

جدول ۲- نمونه برداری در چهار رودخانه

رودخانه	تجن	شیرود	سفیدرود	لمیر
تعداد	۴۸	۴۸	۱۰۰	۵۰

در روش اسپکتروفتومتری با دستگاه Nanodrop: برای تعیین کمیت نمونه ها DNA پس از کالیبره کردن دستگاه Nanodrop با آب مقطر، ۱ میکرولیتر از DNA ژنومی در طول موج ۲۶۰-۲۸۰ نانومتر بوسیله دستگاه اندازه گیری و غلظت آن بر حسب نانوگرم ثبت گردید. غلظت بدست آمده بر حسب ۱۰۰ نانوگرم رقیق شد. در روش الکتروفورزی DNA را بر روی ژل اگارز ۱٪ الکتروفورز کرده، پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۱ درصد) از روی شکل ظاهری، شدت وضوح، داشتن یا نداشتن زمینه، باندهای DNA، کیفیت و تا حدودی کمیت DNA مشخص گردید.

انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تکثیر mtDNA ND5/6 طبق جدول زیر انجام گرفت.

جدول ۳: مواد مورد استفاده برای محصول PCR

مقدار برای واکنش ۵۰ میکرولیتری	غلظت مواد	ماده
$\leq 1 \mu\text{g}$	۱۰۰ نانوگرم	DNA
۰/۲-۰/۵ میکرولیتر	5u/ $\mu\text{L}$	آنزیم تک DNA پلیمرز
۱ میکرولیتر	۱۰ میلی مولار	dNTPs
۳ میکرولیتر	۵۰ میلی مولار	MgCl <sub>2</sub>
۵ میکرولیتر	۱۰X	PCR Buffer
۱ (0.2-1 $\mu\text{M}$ ) میکرولیتر	۲۰/ variable پیکومول	پرایمر ۱
۱ (0.2-1 $\mu\text{M}$ ) میکرولیتر	۲۰/ variable پیکومول	پرایمر ۲
۳۷/۶ میکرولیتر	---	آب مقطر

ویالها در دستگاه مولد چرخه حرارتی (Thermo cycler) به مدت دو ساعت و نیم طبق برنامه انکوبه گردید.

جدول ۴- چرخه حرارتی مورد استفاده

تعداد چرخه‌های حرارتی	زمان (دقیقه)	درجه حرارت	مراحل
۱	۱۰-۵	۹۳-۹۵	واسرشته‌سازی اولیه
۳۰	۰/۵	۹۴	واسرشته‌سازی
	۱	۴۵-۵۲	الحاق
	۱/۵	۷۲	بسط
۱	۱۰	۷۲	بسط نهایی

پس از اتمام کار جهت کنترل کمیت و کیفیت محصول PCR، مقدار ۳ میکرولیتر از محصول PCR و ۲ میکرولیتر لودینگ بافر به همراه مارکر Ladder 100bp بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با استفاده از دستگاه UV محصول PCR مطابق با طول ژن ND5/6 مورد بررسی قرار گرفت. بسته به میزان محصول PCR مشاهده شده بر روی ژل آگارز (۱/۵٪) حجم معینی از محصول PCR، (۳-۵  $\mu\text{L}$ ) برداشته و هضم آنزیمی بر روی آن انجام شد. برای هضم آنزیمی: ابتدا ترکیبات ذیل در یک ویال ۰/۵ میلی لیتری استریل شد.

بافر آنزیم برشگر \* ۱۰  $\mu\text{L}$  ۲  $\mu\text{L}$

آنزیم برشگر ۱ (۱۰u)  $\mu\text{L}$

محصول PCR ۷-۵  $\mu\text{L}$

آب مقطر استریل تا حجم نهایی ۲۰  $\mu\text{L}$

آنزیم های مورد استفاده:

*TasI, HaeIII, HinfI, HincII, SalI, DraI, AccI, AvaII, XbaI, BshNI, Aval, BclI, BshII, MspI, PstI, RsaI, SdnI, TaqI,*

*TruI, VspI*

الکتروفورز محصول بدست آمده از هضم آنزیمی (PCR-RFLP) و رنگ آمیزی ژل پلی اکریل امید با نیترات نقره انجام شد.



## ۲-۲- نتایج

### ۲-۲-۱- نتایج بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

#### الف- روش الکتروفورزی

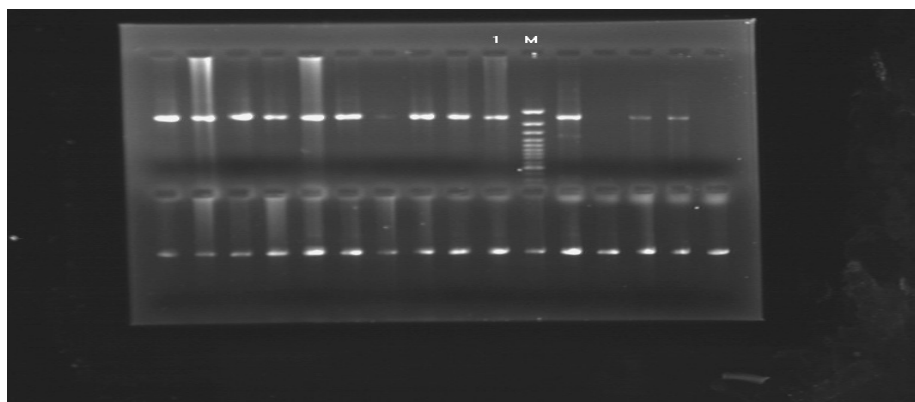
بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (۱ درصد) نشان داد که DNA های استخراج شده به روش فنل - کلروفرم از باله ماهی سفید از کیفیت (فاقد آلودگی پروتئینی / فنلی ، فاقد شکستگی ، آلودگی RNA) و کمیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش های PCR برخوردار می باشد تصویر شماره ۱ نمونه از DNA استخراج شده به روش فنل - کلروفرم بر روی ژل آگارز یک درصد را نشان می دهد.

- نتایج آزمایشات واکنش زنجیره ای پلمیراز

- نتایج الکتروفورز محصول PCR

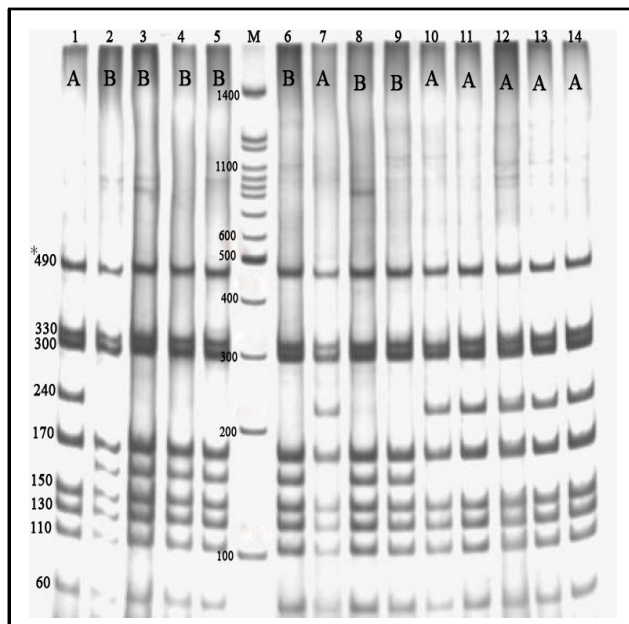
بررسی محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ به همراه مارکر نشان دهنده تکثیر قطعه واحدی به طول bp ۲۵۰۰ جفت باز شامل ناحیه  $ND 5/6$  بر روی مولکول mtDNA می باشد.

در تمامی نمونه ها محصول PCR دارای کمیت و کیفیت بسیار بالائی بود. همچنین طول قطعات حاصل از برش و غیربرش یافته محصول PCR ناحیه  $ND 5/6$  میتوکندریائی در ماهی سفید پس از هضم آنزیمی بر روی ژل اکریل آمید ۶ درصد ( مارکر مورد استفاده 100 bp ladder ) نشان دهنده تکثیر قطعه ای در حد bp ۲۵۰۰ می باشد.

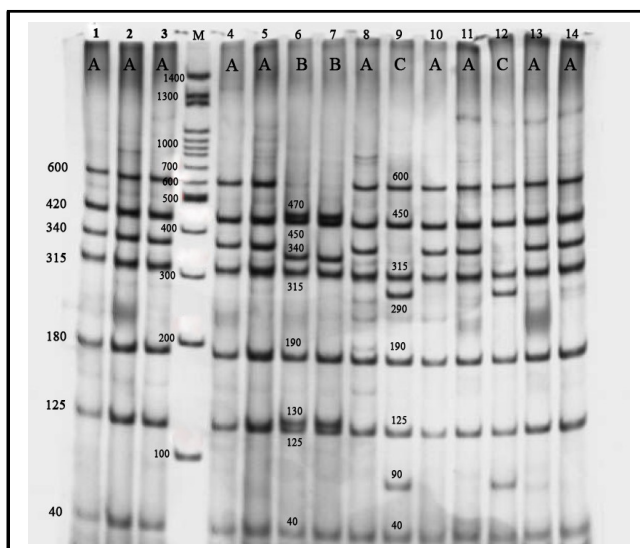


تصویر ۱- ژل الکتروفورز محصول PCR تکثیر شده توسط پرایمرهای  $ND 5/6$  (ژل آگارز ۱ درصد)

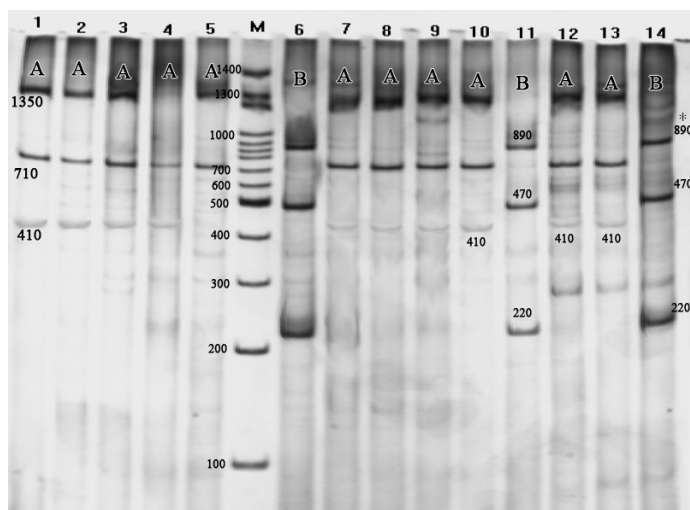
۴ آنزیم برشگر پلی مورفیسم *TasI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HincII* از ۲۰ آنزیم استفاده شده در این تحقیق برای مطالعه تنوع در منطقه ۵/۶ ND مورد استفاده قرار گرفت که در بین نمونه های دو منطقه پلی مورفیسم را نشان دادند که برای تمامی نمونه ها آزمایش گردید.



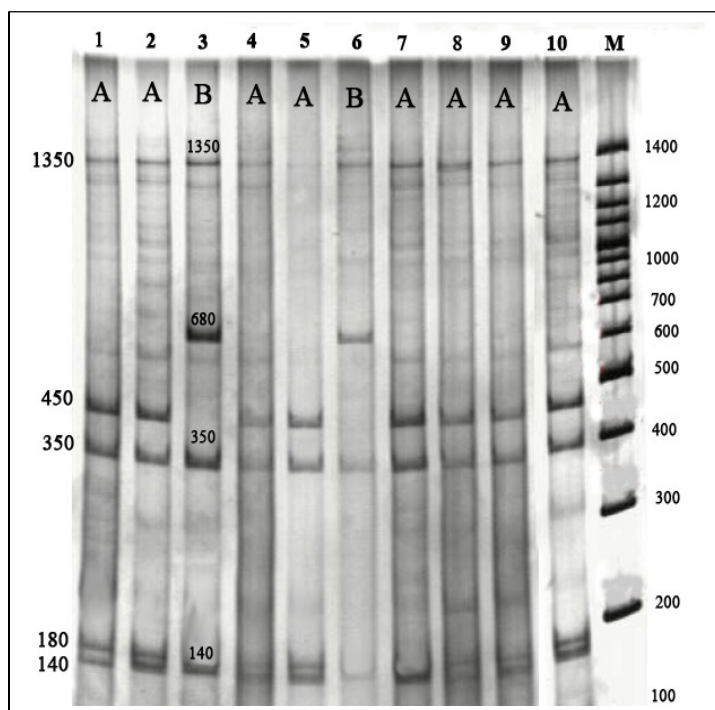
تصویر ۲- الگوی برشی ژن ۵/۶ ND mtDNA ماهی سفید  
با آنزیم *HaeIII* در رودخانه سفیدرود



تصویر ۳- الگوی برشی ژن ۵/۶ ND mtDNA ماهی سفید با آنزیم *HinfI*



تصویر ۱: الگوی برشی ژن  $ND5/6$  mtDNA ماهی سفید با آنزیم *HinCII*



تصویر ۵- الگوی برشی ژن  $ND5/6$  mtDNA ماهی سفید با آنزیم *TasI*

در کل ۲۰ هاپلوتیپ در ۴ رودخانه مورد بررسی بدست آمد که بیشترین فراوانی بترتیب مربوط به هاپلوتیپ های AAAA با ۲۹/۹۳ در صد و BAAA با ۲۷/۵۵ در صد بودند. جداول زیر تعداد و فراوانی هاپلوتیپ ها را نشان میدهد.

جدول ۵- هاپلو تایپ و فراوانی هریک در رودخانه ها

Row	هاپلوتایپ	لمیر (N=98)	%	سفید رود (N=100)	%	شیر رود (N=48)	%	تجن (N=48)	%
1	AAAA	36	36.73	20	20.00	13	27.08	19	39.58
2	BAAA	28	28.57	29	29.00	13	27.08	11	22.92
3	ABAA	6	6.12	8	8.00	4	8.33	2	4.17
4	ACAA	4	4.08	4	4.00	3	6.25	3	6.25
5	AAAC	1	1.02	6	6.00	3	6.25	-	-
6	AAAB	4	4.08	3	3.00	2	4.17	3	6.25
7	ABAB	5	5.10	2	2.00	2	4.17	-	-
8	BBAA	2	2.04	4	4.00	-	-	2	4.17
9	ABBA	2	2.04	5	5.00	2	4.17	3	6.25
10	BDAA	3	3.06	3	3.00	-	-	-	-
11	AABA	3	3.06	3	3.00	4	8.33	3	6.25
12	BCBA	1	1.02	3	3.00	-	-	-	-
13	AABB	1	1.02	1	1.00	-	-	1	2.08
14	ADAA	1	1.02	-	-	-	-	-	-
15	ABAC	2	2.04	2	2.00	-	-	-	-
16	BCAA	2	2.04	2	2.00	1	2.08	-	-
17	BAAB	-	-	2	2.00	1	2.08	-	-
18	BAAC	-	-	-	-	-	-	1	2.08
19	BDAB	-	-	1	1.00	-	-	-	-
20	BABA	-	-	2	2.00	-	-	-	-

جدول ۶- تنوع هاپلوتایپ و نوکلوتید بین جمعیتها

Population	Haplotype Diversity				Nucleotide diversity
	Selfing		Non-Selfing		
Sefid Rud	0.9025	0.01994	0.8969	0.01386	0.009711
لمیر	0.7662	0.04632	0.7613	0.03262	0.007311
شیر رود	0.8549	0.04314	0.8435	0.02987	0.009478
تجن	0.7368	0.07177	0.7270	0.05037	0.008533
Average	0.8151	0.00148	0.8072	0.00149	0.008758

جدول ۷- تنوع نوکلوتیدی (بالای قطر) دایورژن (پایین قطر) میان جمعیت ها

تجن	شیر رود	لمیر	سفید رود	
0.0091	0.0094	0.0087		سفید رود
0.0080	0.0084		0.0002	لمیر
0.0089		0.0000	-0.0002	شیر رود
	-0.0001	0.0001	0.0000	تجن

	Nucleotide Diversity	Nucleotide Divergence
Average	0.0088	0.0000
Minimum	0.0080	-0.0001
Maximum	0.0094	0.0002

جدول ۸- تنوع نوکلئوتید دایورژن بین جمعیت

تجن	شیر رود	لمیر	سفید رود	
				سفید رود
			0.00015273	لمیر
		0.00004021	0.000148515	شیر رود
	0.00005739	0.00008962	0.000016792	تجن

جدول ۹- احتمال  $X^2$  (بالای قطر) و محاسبه  $X^2$  (زیر قطر) بین جمعیت

تجن	شیر رود	لمیر	سفید رود	
0.26	0.89	0.28		سفید رود
0.26	0.38		20.81	لمیر
0.34		16.75	11.58	شیر رود
	13.5	18.16	21.41	تجن

## ۳-۲- بحث و نتیجه گیری

تکثیر منطقه ND5/6 ژنوم میتو کندریایی ماهی سفید شبیه به بقیه ماهیان از جمله ازون برون (Pourkazemi, 1996)،

ماهی شپ (قاسمی، ۱۳۸۲)، کپور معمولی (Gross et al., 2002)،

گره ماهی *Silurus glanis* (Krieg et al., 2000) دارای طول  $2500 \text{ pb}$  می باشد که نشان دهنده صحت تکثیر ژن مورد نظر می باشد.

استفاده از روش مولکولی RFLP بر روی ژن ND5/6 میتو کندریایی برای تعیین تنوع ژنتیکی نشان دهنده سطح پائینی از تنوع نوکلئوتیدی  $0/81$  درصد می باشد. سطح پائینی از تنوع نوکلئوتیدی در گونه های دیگر ماهیان نیز گزارش شده است. Krieg و همکاران (۲۰۰۰) تنوع نوکلئوتیدی در *S. glanis* را در مناطق مختلف بین صفر تا  $0/29$  بدست آوردند و کمی تنوع را ناشی از روش ندانسته بلکه ناشی از فشار صید، عنوان کردند. Triantafyllidis و همکاران (۱۹۹۹) حداکثر تنوع نوکلئوتیدی در *S. glanis* را  $0/17$  درصد و در *S. aristotelis*  $0/66$  گزارش کرده اند. ایشان کم بودن تنوع ژنتیکی را ناشی از کوچک بودن اندازه جمعیت و اندازه جمعیت مؤثر دانسته اند. King و همکاران (۱۹۹۹) در *Slamo salar* میزان تنوع را  $0/1$  درصد بدست آوردند. در گونه های موجود در دریای خزر نیز تنوع نوکلئوتیدی پائینی از جمله تاسماهیان (Pourkazemi, 1996) در ازون برون، شپ (قاسمی، ۱۳۸۲)، ازون برون (شعبانی، ۱۳۸۴)، قره برون (عطائی، ۱۳۸۱)، ماهی سیم (خارا، ۱۳۸۳) گزارش شده است.

عدم تکثیر طبیعی به ذخایر ماهی سفید در طی چند دهه اخیر فشار زیادی را وارد کرده است که عامل مهمی در کاهش تنوع در آبزیان می باشد. اثر تکثیر مصنوعی بر کاهش تنوع ژنی در گونه های مختلفی از ماهیان جمله ماهی سیم (خارا، ۱۳۸۳)، گره ماهی (Krieg et al., 2000) یا در *Salvelinus nmaycush* گزارش شده است.

تکثیر مصنوعی از جمله عوامل دیگر است که تنوع را کاهش می دهد. در تکثیر مصنوعی جمعیت مؤثر کوچک می باشد و کم بودن جمعیت مؤثر تنوع ژنتیکی را در طی چندین نسل کاهش می دهد. بطور کلی تنوع ژنتیکی کم در این گونه را می توان ناشی از دو عامل فشار صید و تکثیر مصنوعی دانست (Innocentiis et al., 2005؛

Kitada& Kishino, 2006).

با استفاده از 20 آنزیم و روش FRLP برای تعیین میزان تنوع در مجموع ۲۷۰ نوکلوتید در این ژن بررسی شد که ۱۴ درصد ژن مورد نظر و ۱/۵ درصد کل ژنوم میتوکندریایی می‌باشد. با توجه به تعداد باز بررسی شده تنوع کم حاصل را نمی‌توان به حساسیت این روش نسبت داد.

تنوع هاپلوتیپی بالا (۰/۸۳) و عدم اختلاف نوکلئوتیدی ماهی سفید شبیه به بقیه ماهیان دریای خزر از جمله ازون برون، شیپ، تاسماهی روسی می‌باشد وجود تنوع هاپلوتیپی بالا در گونه‌های دریایی بسیار رایج می‌باشد زیرا در مکانهای دریایی جدایی جغرافیایی بین جمعیت‌ها وجود ندارد. لذا به راحتی مهاجرت از یک جمعیت به جمعیت دیگر صورت می‌گیرد همانطور که در فراوانی هاپلوتیپ‌ها مشخص است تنها چندین هاپلوتیپ مخصوص به هر رودخانه وجود دارد که فراوانی آنها هم بسیار کم می‌باشد، که از دلایل آن می‌تواند کاهش شدید تکثیر طبیعی بخاطر از بین رفتن زیستگاههای طبیعی در رودخانه های منتهی به دریای خزر، فروانی هاپلوتیپ ها در عین متنوع بودن آنها را به همراه داشته است. نمونه برداری در فصول دیگر ممکن است فراوانی هاپلوتیپها را تغییر دهد. (Chakmehdouz et al 2009)

همانطور که در فراوانی هاپلوتیپ‌های رودخانه ها می‌بینیم هاپلوتیپ AAAA با فراوانی ۳۶/۷۳٪ در رودخانه لمیر و AAAA با فراوانی ۲۰ درصد در رودخانه سفیدرود و با ۲۷/۰۷ درصد در رودخانه شیر رود و ۳۹/۵۸ درصد در رودخانه تجن بیشترین فراوانی‌ها را دارند. این بدین معنی است که تبادل ژنی بین این جمعیت ها بالا می‌باشد و هاپلوتیپ مشخص خاص در بعضی رودخانه وجود دارد و یا اینکه ژنهای مورد بررسی در این تحقیق دارای قابلیت کافی برای تفکیک جمعیت های این گونه نبوده است .

طبق آنالیز ناهمگنی جغرافیایی با استفاده از شبیه سازی Monte carlo  $\chi^2$  با ۱۰۰۰ بار تکرار تفاوت معنی داری بین چهار جمعیت مذکور در سطح ۹۵ درصد وجود دارد (  $X^2 = 56/55$  ,  $p = 0/4810$  ,  $p \leq 0/05$  ) اما در سطح ۹۹٪ اختلافی وجود ندارد. اختلاف کم بین جمعیت‌های مذکور را می‌توان ناشی از مهاجرت بین جمعیت های مذکور دانست. با توجه به نتایج بدست آمده ، برای دستیابی به نتایج بهتر نیاز به بررسی بیشتر و استفاده از ژنهای دیگر ژنوم میتوکندری و یا روشهای مولکولی دیگر از جمله متکی به ژنوم هسته می‌باشند (Herwerden et al., 2003; Keyvanshokoo et al., 2007).

### ۳- بررسی جمعیت ماهی سفید با استفاده از روش ریز ماهواره ها

#### نشانگر DNA

هر گونه تفاوت در ترتیب نوکلئوتیدی DNA که از والدین به نتاج قابل انتقال باشد به عنوان نشانگر مولکولی به کار گرفته می شود و به دو دسته نشانگرهای مبتنی بر پروتئین و مبتنی بر DNA تقسیم می شوند .

تفاوتهای موجود در سطح DNA که هیچ گونه تظاهری ندارند ، نه صفت خاصی را کنترل می کنند و نه در ردیف اسیدهای آمینه رشته های پلی پلوئیدی تاثیر بر جا می گذارند در واقع نشانگرهای DNA چند شکلی موجودات را در سطح DNA تعیین می کنند این نشانگرها ژنوتیپ موجودات را توصیف می کنند و در نتیجه توالیهای کد کننده و غیر کد کننده را در بر می گیرد . بررسی اینگونه تفاوتها که فقط از طریق تجزیه و تحلیل مستقیم DNA امکان پذیر است و به آنها نشانگرهای مولکولی در سطح DNA گویند (جوانروح علی آباد، ۱۳۸۱). فراوانی بالا، هم بازر بودن اکثر این نشانگرها ، امکان به کار گیری آنها در تمام مراحل زندگی حتی دوران جنینی ، عدم تاثیر از شرایط محیطی امکان استفاده از نرم افزارهای رایانه ای مختلف در آنالیز داده ها ، قدرت تمایز بالای این نشانگرها نمایان ساختن تفاوت بین ترتیبهای غیر کننده علاوه بر اختلاف موجود در ترتیبهای کد کننده از مزایای این نشانگرها میباشد. این نشانگرها به دو دسته مبتنی بر PCR و غیر مبتنی بر PCR تقسیم می شوند . انواع مختلفی از این نشانگرها ، با تفاوت های بسیاری از لحاظ تکنیکی ، روش تولید ، نحوه کاربرد و امتیاز بندی و تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع گردیدند و تحولی عظیم در اطلاعات تنوع ژنتیکی ایجاد کرده اند و به عنوان ابزارهای ضروری در ایجاد اهدافی چون بیولوژیک، مطالعات تکاملی و نیز پروژه های نقشه برداری ژنی در آمده اند. از ۲۴ سال گذشته توجه به نشانگرهای DNA افزایش پیدا کرده (دانشور آملی، ۱۳۸۳). ، در ابتدا DNA میتوکندریائی و سپس تکنیکهای مولکولهای پیشرفته کرده به سمت DNA هسته ای سوق پیدا کرده است (Ferguson, 1995).

#### نشانگرهای ریز ماهواره (Microsatellite)

واژه ریز ماهواره در سال ۱۹۸۵ توسط Jeffery مطرح گردید و مفهوم آن توالیهای کوتاه تکرار شونده در ژنوم موجودات می باشد. در دهه گذشته نشانگرهای ریز ماهواره بسیار مورد توجه قرار گرفته اند . علت اصلی کاربرد



این نشانگر، قدرت آن در حل مشکلات بیولوژیکی و تجزیه و تحلیل‌های جمعیتی و همچنین مطالعات اکولوژیکی می‌باشد. تنوع زیاد، قابلیت رتبه‌دهی آسان، همباز بودن و پراکندگی یکنواخت در سراسر ژنوم از دلایل عمده کاربرد وسیع این نشانگر محسوب می‌شود.

فراوانی ریزماهورها متفاوت و بستگی به اندازه ژنوم دارد. برای مثال برآورد شده که فراوانی ریزماهور در ژنوم انسان به طور متوسط ۱۰ برابر ژنوم گیاهان است و توزیع ریزماهورها نه تنها در گونه‌های مختلف متفاوت است، بلکه در درون یک ژنوم و در بین کروموزومهای مختلف نیز متفاوت است از لحاظ توزیع و سازماندهی ریزماهورها در ژنوم‌ها با نقشه‌های ژنتیکی و فیزیکی مشخص شده که ریزماهورها در یک ناحیه جمع نشده و به طور یکنواخت در نواحی مختلف کروموزوم توزیع شده‌اند. اما با روش هیبریداسیون فلورسنت و هیبریداسیون در ژل، مشخص شد که این توالی‌ها در برخی از قسمت‌های کروموزوم تجمع دارند به طور کلی توالیهای مونونوکلئوتیدی (poly A/T) فراوانی بیشتری نسبت به (poly C/G) دارند. آنها در نواحی اینترون و درون ژنی فراوانی بیشتری دارند. در ژنوم انسان نیز poly A /poly T بیشتری وجود دارد، اما این نوع ریزماهورها به دلیل بی ثباتی در واکنش PCR نشانگر مناسبی نیست. Beckman اعلام کردند که بالاترین نوع تکرار در دی نوکلئوتیدی به صورت CA/GT در ژنوم انسان و پستانداران می‌باشد اما در ژنوم گیاهان تکرارهای GA,AT بیشتر از تکرارهای CA می‌باشد. تکرارهای تری نوکلئوتیدی در همه نواحی ژنوم با فراوانی قابل توجهی مشخص شده‌اند و معمولترین آنها تکرارهای ATT,CAG می‌باشند این توالیها بیشتر در اکسون حضور دارند و در نواحی دیگر کمتر دیده می‌شوند و تکرارهای تترانوکلئوتیدی در اکسونها وجود ندارند و تکرارهای پنتانوکلئوتیدی در همه پستانداران به اندازه فراوانی تکرارهای تری نوکلئوتید در اینترونها و نواحی درون ژنی دارند و این توالی تکراری در اکسونها تنوع وسیعی را نشان می‌دهد (بنابازی، ۱۳۸۱). مایکروساتلایتها در ژنوم انسان هر ۳۰ کیلو باز ژنوم سالمون هر ۱۲ کیلو باز ژنوم کاد هر ۷ کیلو باز ژنوم قزل‌الای قهوه ای هر ۲۳ کیلو باز ژنوم زنبور هر ۴۷ کیلو باز وجود دارند و طول توالی مایکروساتلایتها در ژنوم موجودات خونسرد بیشتر از ژنوم سایر موجودات است (Rico et al., 1997).

### تکامل ریز ماهواره ها

به منظور برآورد میزان تنوع در جمعیت و فاصله ژنتیکی از داده های ریز ماهواره و همچنین برای توصیف تنوع ژنتیکی در جایگاههای ریز ماهواره ای دو مدل اساسی جهش آلی نامحدود IAM<sup>۴</sup> و جهش مرحله ای SMM<sup>۵</sup> استفاده می شود. Kimura در اوایل سال ۱۹۶۰ و Crow در سال ۱۹۶۴ جهت درک تحقیقات در سطح مولکولی جمعیتها مدل IAM را پیشنهاد می کنند که پیش بینی می کنند که جهش تنها به حالت آلی جدید می انجامد و همیشه آللهایی در جمعیت به وجود می آید که قبلا وجود نداشته و این حالات می توانند هر تعداد واحد تکرار شوند (مانند GT) رخ می دهد برعکس در مدل SMM که توسط Kimura و Utta در سال ۱۹۷۳ به عنوان یک تئوری در مبحث ژنتیک جمعیت معرفی گردید، پیش بینی می کند که جهش به صورت اضافه شدن یا حذف یک واحد تکرار شونده (مانند GT) رخ می دهد. این بدان معنی است برخی از جهش ها آللهایی را تولید خواهند کرد که از قبل وجود داشته اند. اهمیت استفاده از مدلی که بهتر با داده های ریز ماهواره ای هم خوانی داشته باشد در این است که این کار موجب خواهد شد که برآوردهای دقیق تری از اندازه جمعیت و وقایع ساختاری آن به دست آوریم. البته مدل های دیگری مانند مدل دو مرحله ای و مدل K آلی نیز وجود دارد و هر آلی یک احتمال ثابت تغییرپذیری به طرف هریک K-۱ حالت آلی دیگر است.

مطالعات اولیه بر روی مدل های جهش حاکی از آن است که SMM میزان تنوع مشاهده شده در جایگاههای ریز ماهواره ای را دقیقتر پیش بینی می نماید بررسی انواع ترتیبهای ریز ماهواره ای نشان می دهد که تغییر پذیری جایگاههای سه یا چهار نوکلئوتیدی در مقایسه با جایگاههای دونوکلئوتیدی ماهواره کها شباهت بیشتری با SMM دارند (Hansen, 2004).

### مزایای ریز ماهواره ها

این نشانگرها دارای مزایای متعددی بشرح ذیل می باشد:

- ۱- دارای توارث همباز می باشند و از توارث ساده مندلی تبعیت می کنند. یعنی می توان افراد هتروزیگوت را از هموزیگوت به راحتی تفکیک نمود.

<sup>1</sup> - Infinite Allele Model

<sup>2</sup> - Step Mutation Model

۲- در ژنوم موجودات به فراوانی یافت می شوند و پراکندگی آنها نیز در سطح ژنوم موجودات عالی یکنواخت می باشد .

۳- چند شکل بالائی دارند ، علاوه بر این توانائی آنها در تشخیص میان افراد ، در صورت استفاده از ترکیبی از جایگاهها ، این تکنیک را در مطالعه جریان ژنی و تعیین هویت بسیار توانمند ساخته است .

۴- مقدار بسیار کمی DNA نیاز دارند و به وسیله PCR قابل تکثیر هستند.

۵- امتیاز دهی آنها آسان و دقیق است.

۶- قابلیت استفاده نشانگرهای یک گونه در گونه های بسیار نزدیک دیگر وجود دارد (O'Reilly & Wright, 1995).

### معایب و مشکلات ریز ماهواره ها

از محدودیتها و مشکلات کار با ریز ماهواره ها می توان به موارد زیر اشاره کرد :

#### تعیین توالی:

یکی از مشکلات ریز ماهواره ها که در واقع مشکل عملی و ابتدائی آنهاست. تعیین توالی برای ساخت و طراحی نشانگر مورد نیاز است و در ابتدا باید این عمل انجام شود که انجام آن مستلزم صرف وقت و هزینه زیادی است.

2.5. مروری بر مطالعات انجام شده

Banks و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از نشانگر ریز ماهواره، وجود ۵ زیر جمعیت مجزا را در ماهیان آزاد چینوک (Chinook Salmone Tshawytscha) با استفاده از آنالیز داده های میکروستلایت در ناحیه مرکزی کالیفرنیا نشان دادند.

Susnik و همکاران (۲۰۰۱) که به ساختار جمعیت Grayling (*Thymallus thymalus*) در رودخانه Soca در اسلوانی با استفاده از ۵ لوکوس میکروستلایتی پرداختند و نتوانستند با این روش جمعیت های Adriatic و Denubian را در این رودخانه مشخص کنند.

Adams و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از تکنیکهای Capture & Recapture و Microsatellite به بررسی ساختار جمعیتی قزل آلای رودخانه ای (*Salvalinus fontinallis*) دریاچه های حوضه آبریز خلیج هند پرداختند و اظهار داشتند که علی رغم عدم وجود موانع فیزیکی برای مهاجرت بین دریاچه ها، هر دریاچه جمعیت تولید مثلی

مجزائی دارد. حتی داده‌های نشانه گذاری هم دلالت بر مهاجرت جزئی و عدم مهاجرت بین دریاچه‌ها و همچنین مشاهده کردند که سطح هتروزیگوسیتی جمعیت‌های این گونه در این منطقه نسبت به سایر مناطق بالاتر است.

Herwerden و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از ۸ لوکوس میکروستلایتی به بررسی تنوع و ساختار جمعیتی Red throat emperor (*Lethrinus miniatus*) در ۶ منطقه از ۳ ناحیه جغرافیائی (Great Barrier Reef) پرداختند. داده‌ها فقط یک جمعیت را مشخص کرد.

Renshaw و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه ژنتیکی ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) ۲۰ لوکوس میکروستلایت را کلون و شناسایی نمودند که شامل ۲ دی نوکلئوتید، ۱ تری نوکلئوتید، ۳ تترا و دی نوکلئوتید مرکب، ۹ دی نوکلئوتید و ۵ لوکوس میکروستلایتی ناقص می‌باشند.

Pruett و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) ۲۰ پرایمر میکروستلایت را در ماهی سوکلای خلیج مکزیکو واقع در سواحل جنوبی ایالات متحده مورد استفاده قرار دادند، نتایج حاکی از تغییر تنوع ژنتیکی بین ۰-۰/۹۱۰ و تعداد ۱-۱۵ آلل در جایگاههای مختلف میکروستلایتی می‌باشد.

Smith و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از آلوزایم‌ها و ۸ لوکوس میکروستلایتی به بررسی ساختار جمعیتی ماهی دندان دار (*Dissostichus eleginoides*) در بخش جنوبی اقیانوس اطلس، آرام و هند پرداختند داده‌های آلوزایمی تمایز ژنتیکی کمی را در بین ماهیان دندان دار اقیانوس اطلس جنوبی نشان داد و فرضیه واحد بودن ذخیره ژنتیکی را تایید کرد لکن داده‌های میکروستلایتی تنوع ژنتیکی مشخصی را نشان داده و فرضیه واحد بودن ذخیره ژنتیکی را رد کرد.

Birgitte و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از ۶ لوکوس میکروستلایتی به آنالیز ۱۰ جمعیت اردک ماهی شمال (*Esox lucius*) از اروپا و شمال آمریکا پرداختند و تنوع ژنتیکی بسیار پایین اردک ماهی شمال در داخل جمعیت‌های اروپایی را به جهت کاهش جمعیت موثر در مقیاس زمانی چند هزار ساله که در رابطه با حوادث عصر یخبندان و بعد آن می‌باشد نسبت دادند.

Tani و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی کپورچینی (*Cirrhinus mrigala*) از ۱۰ رودخانه Indus, Gangus, Brahmaputra و Mahanadi تفاوت ناچیزی را بین نمونه های مناطق مختلف مشاهده نمودند.

Thai و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ۴ لوکوس میکروساتلایتی به مطالعه تنوع ژنتیکی ماهی کپور (*Cyprino carpio*) در ویتنام پرداخته و تنوع بالایی را در ماهیان وحشی نسبت به ماهیان پرورشی مشاهده کرد (Thai et al., 2007).

در سال ۲۰۰۵، Gross et al و همکاران مارکرهای مولکولی میکروساتلایت‌ها را نیز برای تفکیک جمعیت‌های کپور معمولی بکار بردند. آنان ۲۲ جمعیت از اروپا، آسیای مرکزی، آسیای شرقی و جنوب شرقی آسیا را مورد مطالعه قرار دادند و نشان داد که تنوع قابل مشاهده توسط لوسی های میکروساتلایت‌ها بمراتب بیشتر از آلوزایم‌ها بود که او در مطالعات قبلی انجام داد. او کلاً ۱۴۳ آلل را ثبت نمود. میانگین تعداد آلل‌ها در هر لوکوس از ۲/۵۰ برای کپور رودخانه Amur تا ۱۴/۲۵ برای جمعیت وحشی کپور در دریاچه Arnasaie ازبکستان و کپور چینی بود. در ایران مطالعات متعددی بر روی گونه های مختلف ماهیان در شمال و جنوب ایران انجام شده است.

نوروزی (۱۳۸۶) از روش مولکولی میکروساتلایت در بررسی ساختار جمعیت‌های ماهی اوزون برون دریای خزر استفاده نمود و توانست جمعیت‌های اوزون برون سواحل جنوبی دریای خزر را از هم جدا نماید. کیوان شکوه و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی جمعیت‌های کلمه ایران (*Rutilus rutilus*) با استفاده از روش میکروساتلایت تفاوتی بین جمعیت انزلی و خلیج گرگان مشاهده نکردند (Keyvanshokoo et al., 2007). قاسمی و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی ساختار جمعیتی جمعیت‌های ایرانی و آذری ماهی سیم (*Abramis brama*) با استفاده از روش میکروساتلایت این دو جمعیت را از هم جدا دانست. ریحانی (۱۳۸۷) در بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) جمعیت این ماهی در روسیه را متفاوت از جمعیت‌های انزلی و خلیج گرگان دانستند، اما نتوانستند تفاوتی بین جمعیت کلمه انزلی و ترکمن مشاهده نمایند.

سالاری (۱۳۸۷) با استفاده از روش مولکولی میکروساتلایت در بررسی ساختار جمعیت‌های ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) توانست سه جمعیت از این ماهی را در بندرعباس، بوشهر و چابهار مشاهده نماید. چمکه دوز در سال ۱۳۸۸ روی ماهی سفید پاییزه و بهاره کار کرد و توانست تفاوت آنها را مشخص نماید.

شجاعی و همکاران (۲۰۰۹) جمعیت های ماهی سفید چند رودخانه دیگر از ایران و آذربایجان را با روش ریز ماهواره مطالعه نمود. جداول ۱۰-۱۴ تعدادی از مطالعات انجام شده را نشان میدهد.

جدول ۱۰- تعدادی از منابع که با روش ریز ماهواره تحقیق کردند

روش تحقیق	موضوع تحقیق	نام محقق و سال تحقیق
ریز ماهواره	ساختار جمعیتی ماهی شپ در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال	صفری ۱۳۸۵
ریز ماهواره	بررسی تنوع ساختار ژنتیکی تاس ماهی ایرانی و تاس ماهی روسی	خوش خلق ۱۳۸۵
ریز ماهواره	بررسی ساختار جمعیت های ماهی اوزون برون دریای خزر	نوروزی ۱۳۸۶
ریز ماهواره	بررسی ژنتیکی جمعیت های کلمه دریای خزر در ایران ( <i>Rutilus rutilus</i> )	کیوان شکوه و همکاران ۱۳۸۶
ریز ماهواره	بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت های ایرانی و اذری ماهی سیم	قاسمی و همکاران ۱۳۸۷
ریز ماهواره	بررسی ساختار جمعیتی ماهی کلمه در ایران و روسیه	ریحانی ۱۳۸۷
ریز ماهواره	بررسی ساختار جمعیت های ماهی سوکلا ( <i>Rachycentron canadum</i> )	رضوانی و همکاران ۱۳۸۸

جدول ۱۱- تعداد پرایمر استفاده شده در بعضی منابع

گونه	تعداد پرایمر	رفرنس
<i>A. nudiventris</i>	4	صفری ۱۳۸۵
<i>Rutilus rutilus</i>	4	ریحانی ۱۳۸۷
<i>Rachycentron canadum</i>	10	سالاری ۱۳۸۷
<i>Esox lucius</i>	7	Lucentini et al., 2006
<i>Catla catla</i>	8	Alam et al., 2005
<i>Oncorhynchus nerka</i>	14	Beacham., 2004
<i>Chines sturgeon</i>	4	Zhao., 2005
<i>Silurius aristotelis</i>	8	Triantafyllidis et al., 2002
<i>Anaocypris hispanica</i>	16	Salguerio et al., 2003
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	10	Taylor, 2007
<i>Rutilus frissi kutum</i>	30	بررسی حاضر

جدول ۱۲- نوع و روش استخراج و تعداد پرایمر

گونه	نوع بافت	روش استخراج	تعداد آغازگر	دفتر
<i>A. nudiventris</i>	باله	فنل - کلروفرم	۴	صفری ۱۳۸۵
<i>Rutilus rutilus</i>	باله	فنل - کلروفرم	۴	ریحانی ۱۳۸۷
<i>Rachycentron canadum</i>	باله	فنل - کلروفرم	۱۰	سالاری ۱۳۸۷
<i>Esox lucius</i>	خون و ماهیچه	فنل - کلروفرم	۱۱	Aguilar., 2005
<i>Clupea harengus</i>	ماهیچه	اتانول		Shaw et al., 1999
<i>Anaocypris hispanica</i>	باله	فنل - کلروفرم		Salguero et al., 2003
<i>A. oxyrhynchus</i>	باله	فنل - کلروفرم	۹	Wirgin., 2002
<i>Esox lucius</i>	باله	کیت		Lucentini et al., 2006
<i>Gadus morhua</i>	خون و ماهیچه	کیت		Dahle et al., 2006
<i>Sparus auratus</i>	باله	فنل - کلروفرم		Innocenti et al., 2005
<i>Rutilus frisii kutum</i>	باله	فنل - کلروفرم	۸	بررسی حاضر

جدول ۱۳- تعداد نمونه در بعضی از منابع را نشان میدهد

گونه	روش کار	کل نمونه	متوسط نمونه در هر منطقه	دفتر
<i>Acipenser nudiventris</i>	ریزماهیواره	۱۰۴	۸-۳۲	صفری ۱۳۸۵
<i>Rutilus rutilus</i>	ریزماهیواره	۹۰	۹۰	ریحانی ۱۳۸۷
<i>Rachycentron canadum</i>	ریزماهیواره	۱۸۴	۲۱-۴۰	رضوانی ۱۳۸۸
<i>Lethrinus miniatus</i>	ریزماهیواره	۵۷۳	۹۰	Herwerden., 2003
<i>Esox lucius</i>	ریزماهیواره	303	11-50	Lucentini et al., 2006
<i>Gadus morhua</i>	ریزماهیواره	170	40	Dahle et al., 2006
<i>Sparus auratus</i>	ریزماهیواره	335	23-85	Innocenti et al., 2005
<i>Salmo salar</i>	ریزماهیواره	984	38-128	Skaala et al., 2004
<i>Esox lucius</i>	ریزماهیواره	۳۰۳	۱۱-۵۰	Lucentini., 2006
<i>Anaocypris hispanica</i>	ریزماهیواره	315		Salguero et al., 2003
<i>Rutilus rutilus</i>	ریزماهیواره	۱۸۰	۶۰	Keyvan shokoh., 2007
<i>Abramis brama</i>	ریزماهیواره	۱۸۰	۶۰	Ghasemi., 2007
<i>Katsuwonus pelamis</i>	ریزماهیواره	۱۵۰	۵۰	Menezes., 2008
<i>Oncorhynchus masou</i>	ریزماهیواره	۲۷۰	۱۹-۶۰	Kitanishi, 2008
<i>Catla catla</i>	ریزماهیواره		40	Alam et al., 2005
<i>Rutilus frisii kutum</i>	ریزماهیواره	120	30	بررسی حاضر

### ۱-۳- روش کار

#### ۱-۳-۱- مواد و تجهیزات مورد نیاز در ریزماهواره ها

##### مواد مصرفی مورد نیاز:

STE شامل NaCl (۱۰۰ mM)، Tris (۱۰ mM)، EDTA (۱ mM) با pH = ۸

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ۲ درصد

پروتئیناز K با غلظت ۱۰ mg/ml

فنل با pH = ۷/۵-۸

8-Hydroxy quinoline با نسبت ۰/۱g درصد (۰/۱g در ۱۰۰ میلی لیتر فنل)

استات سدیم با pH = ۵/۲ و غلظت ۳ مولار

الکل اتانل مطلق و ۷۰ درصد

آنزیم RNase

آگارز

TBE (۱۰\*) شامل: Tris (۸۹۰ mM)، اسید بوریک (۸۹۰ mM) و EDTA (۲۵ mM) با pH = ۸

بافر سنگین کننده (Loading Buffer) شامل: گلیسرول (۵۰ w/v)، EDTA (۱۰ mM) و بروموفنل بلو (۱ درصد)

اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰ mg/ml

DNA هدف

مخلوط dNTP ۶ با غلظت ۲ mM

MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۵۰ mM

بافر (۱۰\*) PCR

آنزیم Taq DNA Polymerase

dH<sub>2</sub>O

پرایمر با غلظت ۲۰۰-۵۰۰ nMol

---

dCTP (دزو کسي تیمیدین تري فسفات) و dTTP (دزو کسي گوانوزین تري فسفات)، dGTP (دزو کسي آدنوزین تري فسفات) شامل: dNTP<sup>6</sup>

(دزو کسي سیتوزین تري فسفات)



مارکر 50 bp Ladder DNA

نمونه ماهی سفید

### دستگاههای مورد استفاده

دستگاههای مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از:

دستگاه ترمال سایکلر<sup>۷</sup>: مدل CorbetResearch

ژل داکيومنتیشن<sup>۸</sup>: Uv-tech

الکتروفورز عمودی: مدل اختریان

الکتروفورز افقی: مدل پویا پژوهش

میکروسانتريفوژ: مدل Eppendorf

اسپكتروفوتومتر: مدل CECIL

بن ماری

انکوباتور

همزن

### ۲-۱-۳- نمونه برداری

نمونه برداری در رودخانه شیررود بوسیله سالیك و سایر رودخانه ها با پره که مولدین صید میشوند در سال ۱۳۸۵ انجام شده است. باله دمی ماهیان پس از صید در الکل اتیلیك مطلق تثبیت و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شده است. جدول ۹ تعداد و محل نمونه برداری از ماهی سفید را نشان می دهد. برای بررسی میکرو ساتلايت از هر رودخانه ۳۰ نمونه استفاده شد.

<sup>7</sup> - Thermal cyclor

جدول ۱۴- تعداد و محل نمونه برداری از ماهی سفید در رودخانه های شیلاتی حوزه جنوبی دریای خزر

رودخانه	تجن	شیرود	سفیدرود	لمیر
تعداد	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰

### ۳-۱-۳- استخراج DNA

استخراج DNA با بهینه کردن روش فنل - کلروفرم انجام گردیده است. در این روش مقدار ۵۰-۱۰۰ میلی گرم از بافت باله را درون یک میکروتیوپ قرار داده و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر STE، ۳۰ میکرولیتر SDS و ۴ میکرولیتر پروتیناز K به آن اضافه شد.

سپس نمونه‌ها بمدت ۳-۴ ساعت در حمام آب گرم ۵۰°C قرار داده شده است (بهتر است نمونه‌ها بمدت یک شب در این حالت بماند).

پس از اینکه بافت باله بخوبی حل گردید، مقدار ۵۰۰ μl فنل به آن اضافه و سپس بمدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی شیکر قرار می گیرد. پس از این مدت نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ rpm بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ لایه رویی را بدقت جدا و به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری دیگر منتقل گردید. مقدار ۵۰۰ μl کلروفرم به آن اضافه و سپس بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می شود (۱۳۰۰۰ rpm).

پس از سانتریفوژ مجدداً لایه روئی را جدا و مقدار ۴۰ μl استات سدیم و حدود ۲ برابر حجم برداشت شده (حدود ۸۰ μl) الکل مطلق به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. رسوب شیری رنگ تشکیل شده را با الکل ۷۰ درجه شستشو و پس از خشک کردن مقدار ۵۰ μl آب مقطر استریل به آن اضافه و بمدت ۳۰-۴۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷°C قرار داده تا DNA حل گردد.

جهت بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم برمایید همراه با مارکر DNA ۱۰۰bp استفاده شد. در روش اسپکتروفتومتری مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شده است.

#### ۴-۱-۳- واکنش PCR

جهت انجام واکنش PCR نیاز به پرایمرهای میکروساتلیت می باشد که در این بررسی توالی پرایمرهای مورد نظر از بانک اطلاعاتی زن بانک بدست آمد. در این بررسی تعداد ۲۰ پرایمر از طریق شرکت MWG آلمان ساخته شد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱۵ نشان داده شده است.

واکنش PCR جهت ازدیاد ناحیه مورد نظریا استفاده از پرایمرهای ساخته شده انجام شده .

PCR با استفاده از ۵ µl بافر PCR (۱۰ X) ، dNTP با غلظت ۲۰۰µM ، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase ، MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۲/۵ mM ، از هر پرایمر ۰/۲ ، ۵۰ تا ۱۰۰ng DNA هدف و آب مقطر به اندازه ای که حجم نهایی محلول به ۲۵ µl برسد ، انجام شد.

برنامه دستگاه ترمال سایکلر بترتیب:

مرحله اول:	Denaturation	مقدماتی	۹۴°c	بمدت ۵ دقیقه
۱ چرخه				
مرحله دوم:	Denaturation		۹۴°c	بمدت ۱ دقیقه
	Annealing		۵۲-۵۴°c	بمدت ۳۰ ثانیه
	Extension		۷۲°c	بمدت ۱ دقیقه
۳۰ چرخه				
مرحله سوم:	Extension		۷۲°c	بمدت ۵ دقیقه
۱ چرخه				

کیفیت و کمیت محصول PCR با استفاده از مارکر PUC19 و الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد و رنگ آمیزی نیترات نقره مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.

#### 5.3.5. آنالیز آماری

فراوانی اللی (Allel frequency) ، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (Expected heterozygosity) و مشاهده شده (Observed heterozygosity) ، تعداد آللها و تعداد آللهای موثر (Effective allel) در جایگاههای میکروساتلاتی ، شاخص

شانون (shanon)، ماتریس شباهت (Genetic similarity) و فاصله ژنتیکی (Genetic distance) براساس Nei,1978؛  
Nei,1972 و تعادل هاردی واینبرگ براساس  $X^2$  و سلسله مراتب جمعیتی دو ناحیه و چهار رودخانه براساس تست  
AMOVA (Analysis of Molecular Variance) در سطح احتمال ۰/۰۱ با استفاده از نرم افزار GeneAlex محاسبه  
گردید.

## ۲-۳- نتایج

کمیت و کیفیت DNA به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن به شرح ذیل می باشد.

الف) روش الکتروفوزی: بررسی شدت وضوح باندهای DNA بر روی ژل آگارز (یک درصد) نشان داد که DNA های استخراج شده از باله ماهی سفید به روش فنل-کلروفرم از کیفیت و کمیت قابل قبولی برای استفاده در آزمایش های PCR برخوردار می باشند. باندهای DNA بسیار قوی و شفاف بودند و این بیانگر آنست که DNA استخراجی فاقد آلودگی پروتئینی، فنلی، آلودگی به RNA است.

### اسپکتروفتومتری DNA

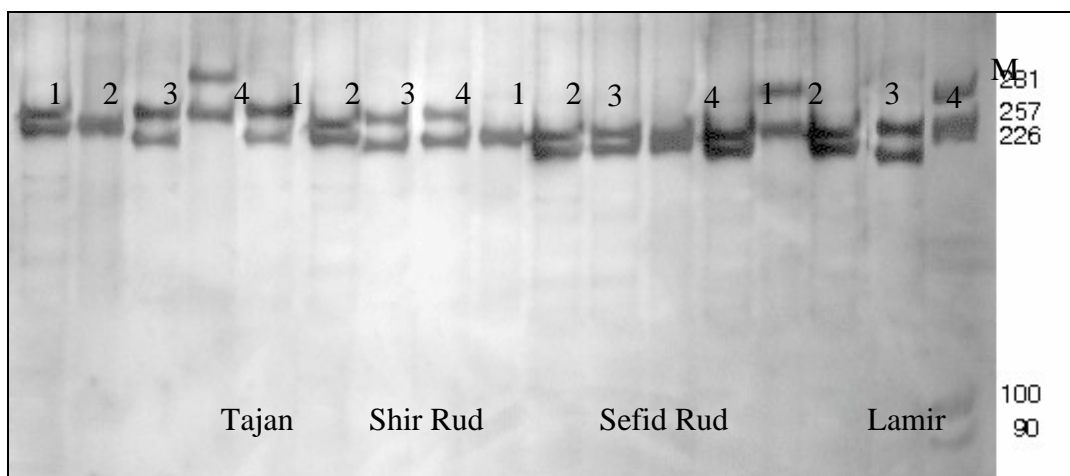
میزان جذب در طول موج ۲۶۰ nm و طول موج ۲۸۰ nm (بوسیله اسپکتروفتومتر محاسبه گردید و نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به عنوان شاخص کمیت می باشد. نمونه هایی که این نسبت برای آنها ۱/۸ تا ۲ بود انتخاب و در مورد نمونه های نامناسب استخراج DNA برای آنها تکرار گردید. غلظت DNA استخراجی بر اساس فرمول محاسبه شده در کلیه ۱۰۴ نمونه بین ۱۵۰-۲۵۰ ng/l بود که پس از رقیق سازی و همسان سازی غلظت DNA، در غلظت ۱۰۰ ng/l مورد استفاده قرار گرفت.

## ۲-۳- نتایج حاصل از PCR

قطعه مورد نظر با استفاده از دستگاه PCR تکثیر گردید. سپس محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶٪ الکتروفورز و با نیترا ت نقره رنگ آمیزی شد که نتایج زیر به دست آمد.

### جایگاه SYP4

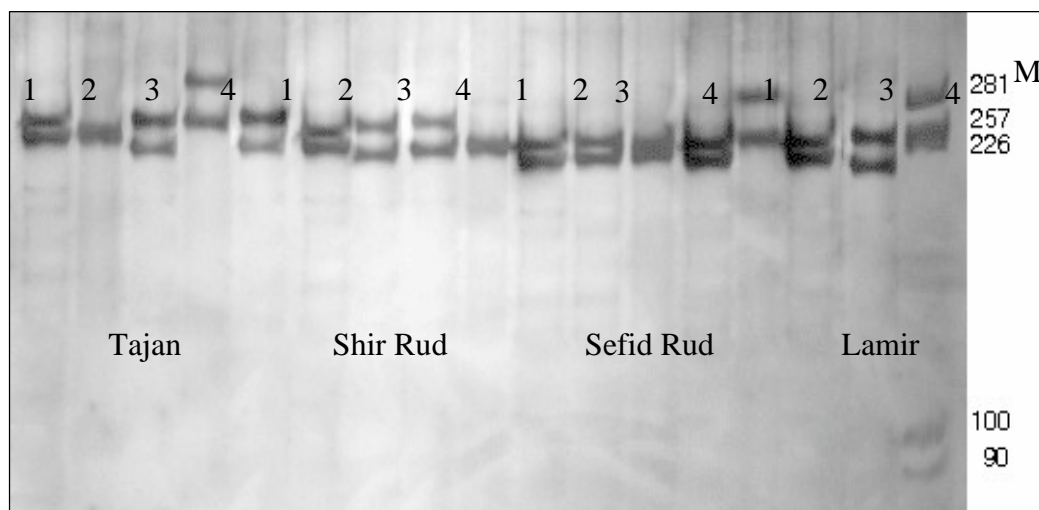
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای درجه سانتیگراد مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد ال مشاهده شده برای این جایگاه در ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه ۱۹ ال و دامنه اندازه الی بین ۱۹۶-۲۹۶ جفت باز بود (تصویر ۶).



تصویر ۶- محصول PCR واریش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر SYP4

#### جایگاه SYP2

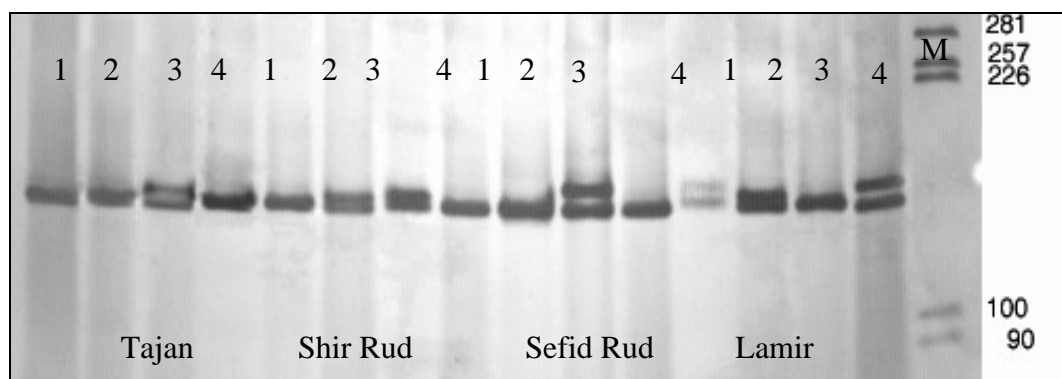
پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای C<sup>?</sup> مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد ال مشاهده شده برای این جایگاه در ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه ۱۸ ال و دامنه اندازه الی بین ۲۸۴-۱۹۶ جفت باز بود (تصویر ۷).



تصویر ۷- محصول PCR واریش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر SYP2

### جایگاه SYP6

پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای  $37^{\circ}\text{C}$  مناسبترین دما برای اتصال این پرایمربدست آمد. تعداد الل مشاهده شده برای این جایگاه در ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه ۳ الل و دامنه اندازه اللی بین ۱۲۲-۱۳۲ جفت باز بود (تصویر ۸).



تصویر ۲: محصول PCR واریش باند DNA ماهی سفید دریای خزر با استفاده از پرایمر SYP6

### جایگاه SYP5

پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای  $37^{\circ}\text{C}$  مناسبترین دما برای اتصال این پرایمربدست آمد. تعداد الل مشاهده شده برای این جایگاه در ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه ۴ الل و اندازه اللی ۱۵۶-۱۹۲ جفت باز بود.

### جایگاه CA7.8

پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای  $37^{\circ}\text{C}$  مناسبترین دما برای اتصال این پرایمربدست آمد. تعداد الل مشاهده شده برای این جایگاه در ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه ۷ الل و اندازه اللی ۱۲۴-۱۵۲ جفت باز بود.

### جایگاه CA5.6

پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای  $37^{\circ}\text{C}$  مناسبترین دما برای اتصال این پرایمربدست آمد. تعداد الل مشاهده شده برای این جایگاه در ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه ۸ الل و اندازه اللی ۱۳۶-۱۶۸ جفت باز بود.

### جایگاه CA3.4

پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای C ۳۲ مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد ال مشاهده شده برای این جایگاه در ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه ۱۲ ال و اندازه اللی ۲۳۲-۲۷۶ جفت باز بود.

### جایگاه CA1.2

پس از بهینه سازی واکنشهای PCR دمای C ۵۱ مناسبترین دما برای اتصال این پرایمر بدست آمد. تعداد ال مشاهده شده برای این جایگاه در ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه ۶ ال و اندازه اللی ۱۰۴-۱۲۴ جفت باز بود.

جدول ۱۵- خصوصیات و نتایج بدست آمده از جایگاههای پلی مورف

ردیف	توالی تکراری	نام جایگاه	محدوده بانندی (جفت باز)	دمای اتصال درجه سانتی گراد	تعداد ال مشاهده
۱	F: 5'-CAC GGG ACA ATT TGG ATG TTT TAT- 3' R: 5'-AGG GGG CAG CAT ACA AGA GAC AAC- 3'	SYP4	۱۹۶-۲۹۶	60	۱۹
۲	F: 5'-GCA GGA GCG AAA CCA TAA AT- 3' R: 5'-AAA CAG GCA GGA CAC AAA GG- 3'	SYP2	۱۹۶-۲۸۴	58	۱۸
۳	F: 5'-TTA CAC AGC CAA GAC TAT GT- 3' R: 5'-CAA GTG ATT TTG CTT ACT GC- 3'	SYP6	۱۳۲-۱۲۲	57	۳
۴	F: 5'-ATT TTT AGG AGT GAT GTT CAG CAT- 3' R: 5'-CAA GTG TGT CAT TGA GGA AGT GAG- 3'	SYP5	۱۹۲-۱۵۶	53	۴
۵	F: 5'-GTG AAG CAT GGC ATA GCA CA-3' R: 5'-CAG GAA AGT GCC AGC ATA CAC- 3'	CA7.8	۱۵۲-۱۲۴	61	۷
۶	F: 5'-TTG AGT GGA TGG TGC TTG TA- 3' R: 5'-GCA TTG CCA AAA GTT ACC TAA- 3'	CA5.6	۱۶۸- ۱۳۶	55	۸
۷	F: 5'-GGA CAG TGA GGG ACG CAG AC- 3' R: 5'-TCT AGC CCC CAA ATT TTA CGG- 3'	CA3.4	۲۷۶-۲۳۲	61	۱۲
۸	F: 5'-AAG ACG ATG CTG GAT GTT TAC- 3' R: 5'-CTA TAG CTT ATC CCG GCA GTA- 3'	Ca1.2	۱۲۴-۱۰۴	51	۶



### ۱-۲-۳- الهای پلی مورف (چند شکلی)

مطابق با تعریف پلی مورف بودن (فراوانی الی کمتر از ۹۹ درصد است) ، تمام جایگاههای مورد آنالیز پلی مورف هستند. فراوانی الی جایگاههای مورد مطالعه در جدول ۱۶ آمده است.

جدول ۱۶- الیها و اندازه های ان (جفت باز) در سه جایگاه مختلف پلی مورفیک در ماهی سفید

جایگاه-الی	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
A	۱۹۶	۱۹۶	۱۲۲	۱۵۶	۱۲۴	۱۲۴	۲۳۲	۱۰۴
B	۲۰۰	۲۰۰	۱۲۸	۱۶۰	۱۲۸	۱۲۸	۲۳۶	۱۰۸
C	۲۱۶	۲۰۴	۱۳۲	۱۸۴	۱۳۲	۱۳۲	۲۴۰	۱۱۲
D	۲۲۰	۲۰۸	-	۱۹۲	۱۳۶	۱۳۶	۲۴۴	۱۱۶
E	۲۲۴	۲۱۶	-	-	۱۴۰	۱۴۰	۲۴۸	۱۲۰
F	۲۳۲	۲۲۰	-	-	۱۴۴	۱۴۴	۲۵۲	۱۲۴
G	۲۳۶	۲۲۶	-	-	۱۴۸	۱۴۸	۲۵۶	-
H	۲۴۰	۲۲۸	-	-	-	۱۵۶	۲۶۰	-
I	۲۴۴	۲۳۲	-	-	-	-	۲۶۴	-
J	۲۴۸	۲۳۶	-	-	-	-	۲۶۸	-
K	۲۵۲	۲۴۸	-	-	-	-	۲۷۲	-
L	۲۵۶	۲۵۶	-	-	-	-	۲۷۶	-
M	۲۶۰	۲۶۴	-	-	-	-	-	-
N	۲۶۴	۲۷۲	-	-	-	-	-	-
O	۲۶۸	۲۷۶	-	-	-	-	-	-
P	۲۷۲	۲۸۰	-	-	-	-	-	-
Q	۲۷۶	۲۸۴	-	-	-	-	-	-
R	۲۸۰	-	-	-	-	-	-	-
S	۲۹۶	-	-	-	-	-	-	-

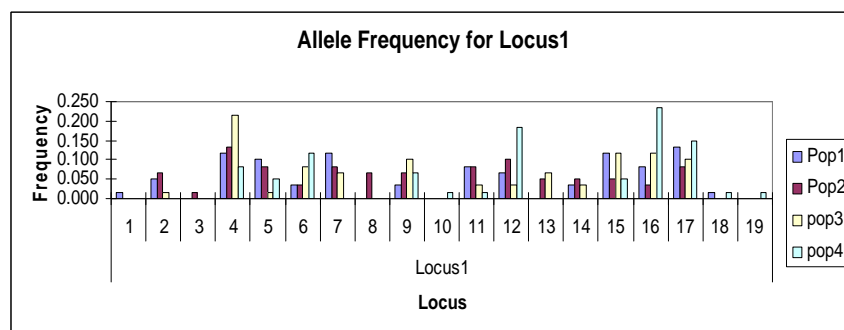
فراوانی آلی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک مورد مطالعه در ماهی سفید برحسب مناطق

نمونه برداری در جداول ۱۷-۲۴ و شکل های ۱ الی ۸ آمده است.

جدول ۱۷- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

Locus SPY4

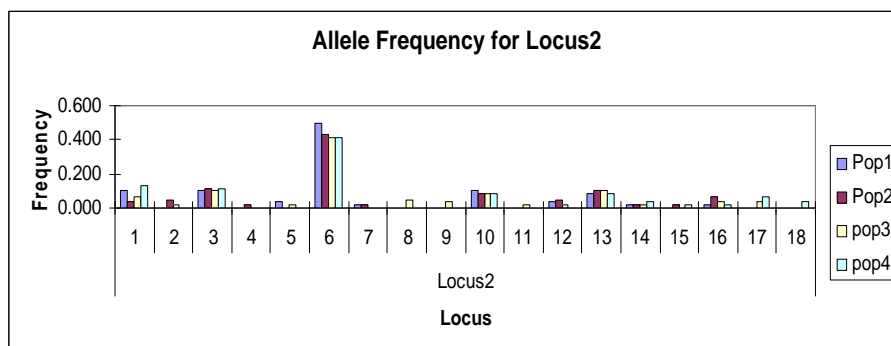
Allele	تجن	شیرود	سفیدرود	لمبر
1	0.017	0.000	0.000	0.000
2	0.050	0.067	0.017	0.000
3	0.000	0.017	0.000	0.000
4	0.117	0.133	0.217	0.083
5	0.100	0.083	0.017	0.050
6	0.033	0.033	0.083	0.117
7	0.117	0.083	0.067	0.000
8	0.000	0.067	0.000	0.000
9	0.033	0.067	0.100	0.067
10	0.000	0.000	0.000	0.017
11	0.083	0.083	0.033	0.017
12	0.067	0.100	0.033	0.183
13	0.000	0.050	0.067	0.000
14	0.033	0.050	0.033	0.000
15	0.117	0.050	0.117	0.050
16	0.083	0.033	0.117	0.233
17	0.133	0.083	0.100	0.150
18	0.017	0.000	0.000	0.017
19	0.000	0.000	0.000	0.017



شکل ۲- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

جدول ۱۸- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

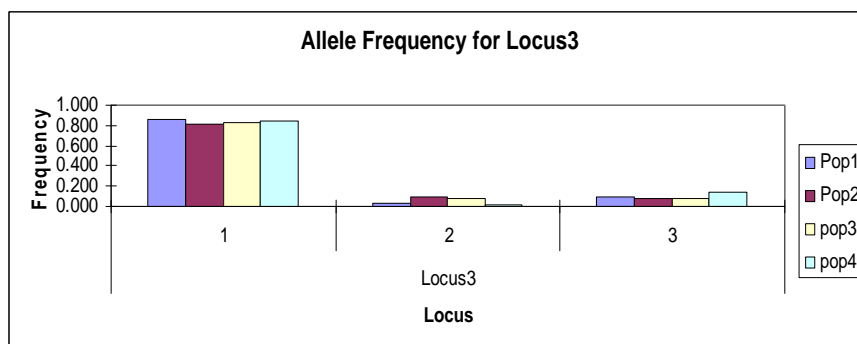
Allele	تجن	شیروود	سفیدرود	لمیر
1	0.100	0.033	0.067	0.133
2	0.000	0.050	0.017	0.000
3	0.100	0.117	0.100	0.117
4	0.000	0.017	0.000	0.000
5	0.033	0.000	0.017	0.000
6	0.500	0.433	0.417	0.417
7	0.017	0.017	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.050	0.000
9	0.000	0.000	0.033	0.000
10	0.100	0.083	0.083	0.083
11	0.000	0.000	0.017	0.000
12	0.033	0.050	0.017	0.000
13	0.083	0.100	0.100	0.083
14	0.017	0.017	0.017	0.033
15	0.000	0.017	0.000	0.017
16	0.017	0.067	0.033	0.017
17	0.000	0.000	0.033	0.067
18	0.000	0.000	0.000	0.033



شکل ۲- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

جدول ۱۹- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

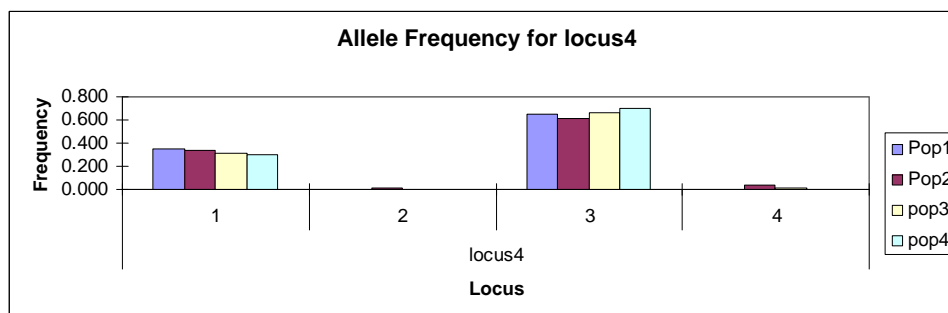
Locus	Allele	تجن	شیروود	سفیدرود	لمیر
SPY6	1	0.867	0.817	0.833	0.850
	2	0.033	0.100	0.083	0.017
	3	0.100	0.083	0.083	0.133



شکل ۳- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

جدول ۲۰- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

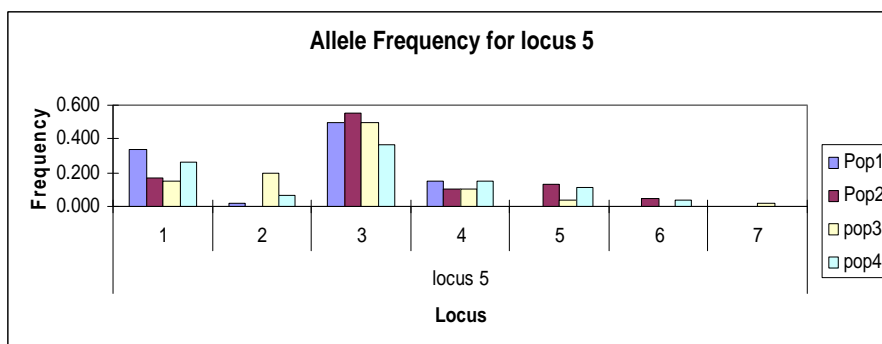
لایمیر	سفیدرود	شیروود	تجن	Allele	Locus
0.300	0.317	0.333	0.350	1	SPY5
0.000	0.000	0.017	0.000	2	
0.700	0.667	0.617	0.650	3	
0.000	0.017	0.033	0.000	4	



شکل ۴- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

جدول ۲۱- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

Locus CA12					
Allele	تجن	شیروود	سفیدرود	لایمیر	
1	0.333	0.167	0.150	0.267	
2	0.017	0.000	0.200	0.067	
3	0.500	0.550	0.500	0.367	
4	0.150	0.100	0.100	0.150	
5	0.000	0.133	0.033	0.117	
6	0.000	0.050	0.000	0.033	
7	0.000	0.000	0.017	0.000	

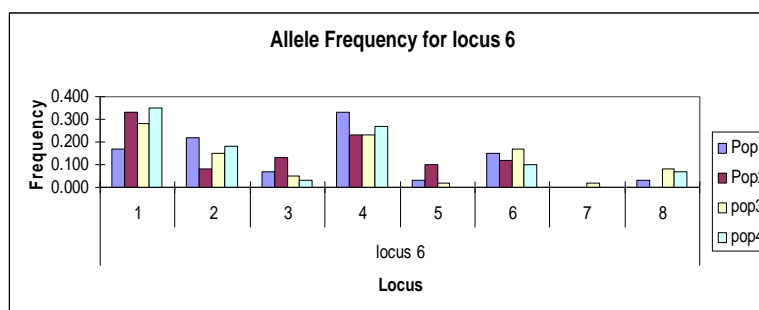


شکل ۵- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

جدول ۲۲- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

Locus CA5

Allele	تجن	شیرود	سفیدرود	لمیر
1	0.167	0.333	0.283	0.350
2	0.217	0.083	0.150	0.183
3	0.067	0.133	0.050	0.033
4	0.333	0.233	0.233	0.267
5	0.033	0.100	0.017	0.000
6	0.150	0.117	0.167	0.100
7	0.000	0.000	0.017	0.000
8	0.033	0.000	0.083	0.067

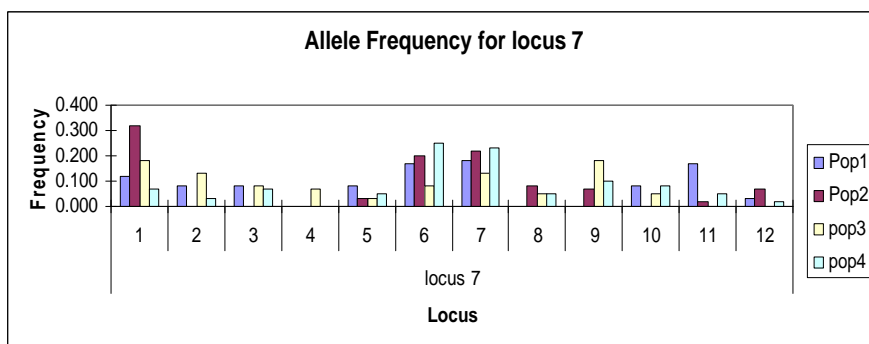


شکل ۶- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

جدول ۲۳- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

Locus CA3

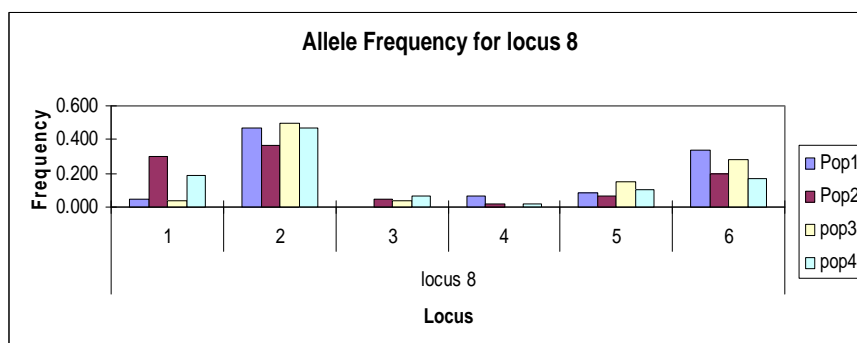
Allele	تجن	شیرود	سفیدرود	لمیر
1	0.117	0.317	0.183	0.067
2	0.083	0.000	0.133	0.033
3	0.083	0.000	0.083	0.067
4	0.000	0.000	0.067	0.000
5	0.083	0.033	0.033	0.050
6	0.167	0.200	0.083	0.250
7	0.183	0.217	0.133	0.233
8	0.000	0.083	0.050	0.050
9	0.000	0.067	0.183	0.100
10	0.083	0.000	0.050	0.083
11	0.167	0.017	0.000	0.050
12	0.033	0.067	0.000	0.017



شکل ۷- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

جدول ۲۴- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

Locus CA1				
Allele	تجن	شیرود	سفیدرود	لمبر
1	0.050	0.300	0.033	0.183
2	0.467	0.367	0.500	0.467
3	0.000	0.050	0.033	0.067
4	0.067	0.017	0.000	0.017
5	0.083	0.067	0.150	0.100
6	0.333	0.200	0.283	0.167



شکل ۸- فراوانی آللی جایگاههای مختلف میکروستلایتی پلی مورفیک

۲-۲-۳- تعداد الل واقعی (na) و موثر (ne)

معیار دیگری که برای تعیین میزان چند شکلی (پلی مورفیسم) جایگاهها استفاده می شود تعداد الل واقعی و موثر

است. تعداد الل واقعی (na) و موثر (ne) در جدول ۲۵ آمده است.

جدول ۲۵- تعداد الل واقعی و موثر پنج جایگاه بررسی شده در ماهی سفید

جایگاه الل	تجن n=۳۰		شیرود n=۳۰		سفیدرود n=۳۰		لمیر n=۳۰	
	na	ne	na	ne	na	ne	na	ne
۱	14	10.714	15	12.676	13	8.780	12	7.059
۲	10	3.448	12	4.348	14	4.712	10	4.423
۳	3	1.312	3	1.462	3	1.412	3	1.350
۴	2	1.835	4	2.029	3	1.835	2	1.724
5	4	2.605	5	2.773	6	3.087	6	4.045
6	7	4.651	6	4.675	8	5.128	6	4.119
7	9	7.595	8	4.891	10	7.860	11	6.593
8	5	2.917	6	3.681	5	2.817	6	3.403

۳-۲-۳- تنوع ژنتیکی

جدول ۲۶- مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده ( $H_o$ ) و مورد انتظار ( $H_e$ )

برای نواحی نمونه برداری در هر جایگاه

جایگاه الل	کلیه مناطق		تجن n=۳۰		شیرود n=۳۰		سفیدرود n=۳۰		لمیر n=۳۰	
	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$
۱	0.592	0.893	0.533	0.907	0.967	0.921	0.533	0.886	0.467	0.858
۲	0.508	0.760	0.333	0.710	0.833	0.770	0.667	0.788	0.467	0.774
۳	0.317	0.276	0.267	0.238	0.567	0.316	0.333	0.292	0.300	0.259
۴	0.133	0.459	0.167	0.455	0.367	0.507	0.133	0.455	0.067	0.420
5	0.400	0.671	0.433	0.616	0.167	0.639	0.400	0.676	0.467	0.753
6	0.458	0.783	0.300	0.785	0.300	0.786	0.533	0.805	0.467	0.757
7	0.342	0.846	0.400	0.868	0.533	0.796	0.300	0.873	0.300	0.848
8	0.908	0.684	0.967	0.657	0.367	0.728	1.000	0.645	0.900	0.706

چون حد نهایی هتروزیگوسیتی یک است و تفاوت میان مقادیر در چنین محدوده ای به خصوص برای نشانگرهای بسیار چند شکلی مثل ریزماهواره ها (که در اکثر موارد هتروزیگوسیتی حدود ۸/۰ یا بالاتر دارند) به میزانی نمی باشد که اطلاعات دقیقی را بیان کند. بنابراین برای بزرگنمایی این مقادیر شاخص اطلاعات shanon استفاده شد.

جدول ۲۷- شاخص اطلاعاتی شانون Shanon index در نواحی  
نمونه برداری و جایگاههای مختلف الی

جایگاه الی	تجن	شیروود	سفیدرود	لمیر
۱	2.472	2.613	2.338	2.146
۲	1.676	1.917	2.044	1.842
۳	0.468	0.603	0.566	0.475
۴	0.647	0.846	0.703	0.611
5	1.066	1.276	1.365	1.549
6	1.688	1.662	1.773	1.555
7	2.101	1.767	2.167	2.116
8	1.259	1.450	1.215	1.444

#### ۴-۲-۳- تعادل هاردی - واینبرگ

به منظور بررسی تعادل هاردی واینبرگ در تمامی نواحی مورد بررسی و جایگاههای مختلف از آزمون  $X^2$  استفاده شد. در جدول ۲۸ نشان میدهد که در تمامی جایگاه ها و همه رودخانه های مطالعه شده اختلاف معنی دار وجود دارد به جز جایگاه در SPY6 و گویای اینست که جمعیت از تعادل ژنتیکی خارج شده است.



جدول ۲۸- تمایز بین مناطق نمونه برداری (Fit)<sup>۱</sup>، نواحی هر منطقه (Fst or Rst)<sup>۲</sup> و نمونه های هر ناحیه (Fis)<sup>۳</sup>

جمعیت	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
تجن	SPY4	91	199.842	0.000	***
	SPY2	45	153.267	0.000	***
	SPY6	3	0.710	0.871	ns
	SPY5'	1	12.047	0.001	***
	CA12	6	30.370	0.000	***
	CA5	21	111.662	0.000	***
	CA3	36	127.978	0.000	***
	CA1	10	69.260	0.000	***
شیرود	SPY4	105	160.500	0.000	***
	SPY2	66	170.570	0.000	***
	SPY6	3	1.512	0.680	ns
	SPY5'	6	46.762	0.000	***
	CA12	10	49.577	0.000	***
	CA5	15	67.355	0.000	***
	CA3	28	79.316	0.000	***
	CA1	15	31.713	0.007	**
سفیدرود	SPY4	78	147.904	0.000	***
	SPY2	91	150.621	0.000	***
	SPY6	3	1.200	0.753	ns
	SPY5'	3	17.785	0.000	***
	CA12	15	52.633	0.000	***
	CA5	28	41.777	0.046	*
	CA3	45	180.048	0.000	***
	CA1	10	30.000	0.001	***
لمیر	SPY4	66	127.003	0.000	***
	SPY2	45	136.164	0.000	***
	SPY6	3	0.934	0.817	ns
	SPY5'	1	21.232	0.000	***
	CA12	15	70.876	0.000	***
	CA5	15	43.179	0.000	***
	CA3	55	187.974	0.000	***
	CA1	15	29.445	0.014	*

برای تعیین اختلاف بین مناطق و نواحی هر منطقه و نمونه های هر ناحیه از شاخصهایی همچون Fst, Fit و Fis

استفاده می شود. ضریب همخوانی (Fis) در نمونه های هر ناحیه در جدول ۲۹ آمده است.

جدول ۲۹: میزان Fis محاسبه شده در نمونه های ایستگاههای نمونه برداری

جایگاه ال	تجن	شیروود	سفیدرود	لمیر
۱	0.412	0.095	0.398	0.456
۲	0.531	0.264	0.154	0.397
۳	0.121	0.160	-0.143	0.156
۴	0.634	0.671	0.707	0.841
۵	0.297	0.531	0.408	0.380
۶	0.618	0.322	0.337	0.384
۷	0.539	0.539	0.656	0.646
۸	0.471	0.053	-0.550	0.275

جدول ۳۰: میزان Fst محاسبه شده با کمک تست AMOVA برای نواحی نمونه برداری ( اعداد بالای قطر احتمال و زیر قطر میزان اختلاف را نشان میدهد)

تجن	شیروود	سفیدرود	لمیر
تجن	۰	0.010	0.040
شیروود	0.017	۰	0.040
سفیدرود	0.008	0.013	0.080
لمیر	0.009	0.013	0.009

با توجه به شباهت بالایی که دیدیم تست rst مناسبتر به نظر می رسد.

تجن	شیروود	سفیدرود	لمیر
تجن	۰	0.120	0.090
شیروود	0.016	۰	0.010
سفیدرود	0.001	0.002	0.040
لمیر	0.025	0.056	0.031

تنوع ژنتیکی بر اساس سلسله مراتب جمعیتی ۲ منطقه و ۴ رودخانه) و بر اساس تست AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance) در سطح احتمال ۹۹٪ اختلاف بین مناطق نمونه برداری ( $P \leq 0.01$  و ۰٪)، اختلاف بین نواحی هر منطقه نمونه برداری ( $P \leq 0.01$  و ۱٪)، اختلاف بین افراد درون ناحیه ( $P \leq 0.01$  و ۹۹٪) محاسبه شد.

جدول ۳۱- اختلاف بین مناطق نمونه برداری ، بین نواحی و بین افراد مختلف

احتمال	FStat	
	۰,۴٪	اختلاف بین مناطق نمونه برداری
0.01	1٪	اختلاف بین نواحی نمونه برداری
0.01	۹۵٪	اختلاف بین افراد مختلف در هر ناحیه نمونه برداری هرایستگاه نمونه برداری

احتمال	RStat	
	۰,۴٪	اختلاف بین مناطق نمونه برداری
0.01	۱٪	اختلاف بین نواحی نمونه برداری
0.01	۹۵٪	اختلاف بین افراد مختلف در هر ناحیه نمونه برداری هرایستگاه نمونه برداری

جدول ۳۲: ماتریس تعداد ماهیان مهاجر بین نواحی (زیر قطر) و  $F_{st}$

(بر اساس فراوانی اللی مورد بررسی) (بالای قطر)

لمیر	سفیدرود	شیرود	تجن	
0.011	0.011	0.015		تجن
0.014	0.014	۰	15.925	شیرود
0.012	۰	17.983	22.707	سفیدرود
۰	20.999	17.979	21.773	لمیر

لمیر	سفید رود	Fst (via Frequency)	Nm	#لمیر	#سفید رود
لمیر	سفید رود	0.015	15.925	30	30
لمیر	شیرود	0.011	22.707	30	30
سفید رود	شیرود	0.014	17.983	30	30
لمیر	تجن	0.011	21.773	30	30
سفید رود	تجن	0.014	17.979	30	30
شیرود	تجن	0.012	20.999	30	30

لمیر	سفید رود	Rst	Nm	#لمیر	#سفید رود
لمیر	سفید رود	0.016	15.669	30	30
لمیر	شیرود	0.001	204.378	30	30
سفید رود	شیرود	0.002	130.947	30	30
لمیر	تجن	0.025	9.792	30	30
سفید رود	تجن	0.056	4.228	30	30
شیرود	تجن	0.031	7.824	30	30

## ۵-۲-۳- شباهت و فواصل ژنتیکی

زمانی که داده های ژنتیکی از چند جمعیت بدست می آید اولین سوالی که مطرح می شود این است که شباهت ژنتیکی جمعیتها چقدر است. عموماً عقیده بر اینست که ارتباط جمعیتها مربوط به زمانی است که آنها از یک جد مشترک انشقاق یافتند که این نیازمند مدل ژنتیکی مشخص می باشد تا فرایندهایی از قبیل جهش و تفرق را در جمعیتهای جدا شده تعیین کند. فاصله ژنتیکی طرحی است که برای بیان تفاوت میان جمعیتها مطرح می شود. اگر هیچ تفاوتی وجود نداشته باشد فاصله ژنتیکی صفر خواهد بود و اگر جمعیتها در هیچ یک از مکانهای ژنی ال مشترک نداشته باشند فاصله ژنتیکی حداکثر یعنی مساوی یک خواهد بود.

جدول ۳۳: ماتریس فواصل ژنتیکی (زیر قطر)  
و شباهت ژنتیکی (بالای قطر) (Nei, 1978).

لمیر	سفیدرود	شیروود	تجن	
0.949	۰,۹۵۱	۰,۰۹۳۲	۰	تجن
0.936	۰,۹۳۴		0.070	شیروود
0.945		0.068	0.050	سفیدرود
	0.057	0.066	0.053	لمیر

بر اساس معیار Nei, (1978) بیشترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های رودخانه شیروود با تجن و کمترین فاصله ژنتیکی میان نمونه های سفیدرود با تجن وجود دارد و بالطبع بیشترین شباهت ژنتیکی میان نمونه های تجن با سفیدرود و کمترین میان نمونه های تجن با شیروود بود.

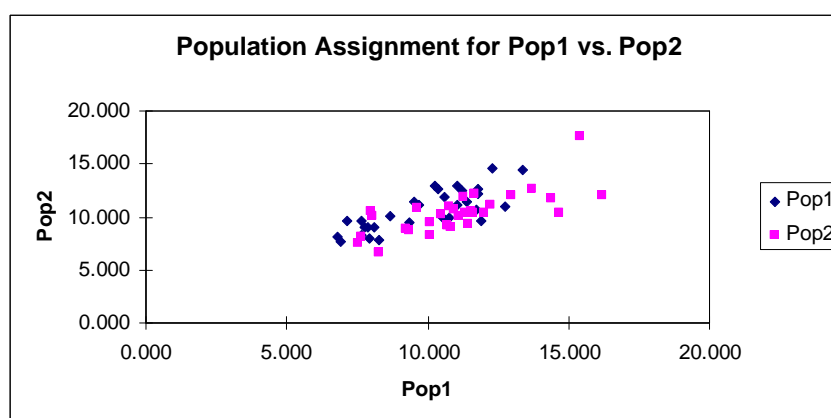
جدول ۳۴- بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در سطح جایگاهها برای همه نمونه ها

p≤0/05 \*, P≤0/001 \*\*\*, ns no significant and sig significant

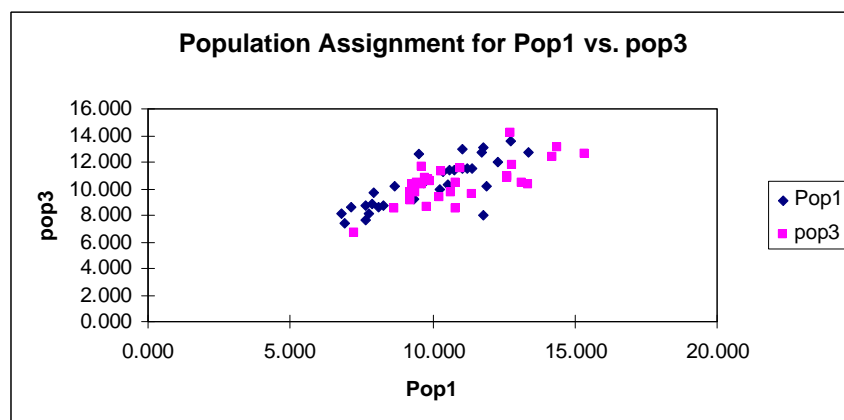
جایگاه	X <sup>2</sup>	احتمال	معنی دار بودن اختلاف
۱ کل نمونه ها	۱۵۲,۶	۰,۰۰	***
۲ کل نمونه ها	۱۵۸,۸	۰,۰۰	***
۳ کل نمونه ها	۱,۰۸	ns	ns
۴ کل نمونه ها	۲۴,۴۵	۰,۰۰	***
۵ کل نمونه ها	۵۰,۸۶	۰,۰۰	***
۶ کل نمونه ها	۶۵,۹۹	۰,۰۰	***
۷ کل نمونه ها	۱۴۳,۹۲	۰,۰۰	***
۸ کل نمونه ها	۴۰	۰,۰	*

### ۶-۲-۳- شکل سنجش جفت جمعیت ها

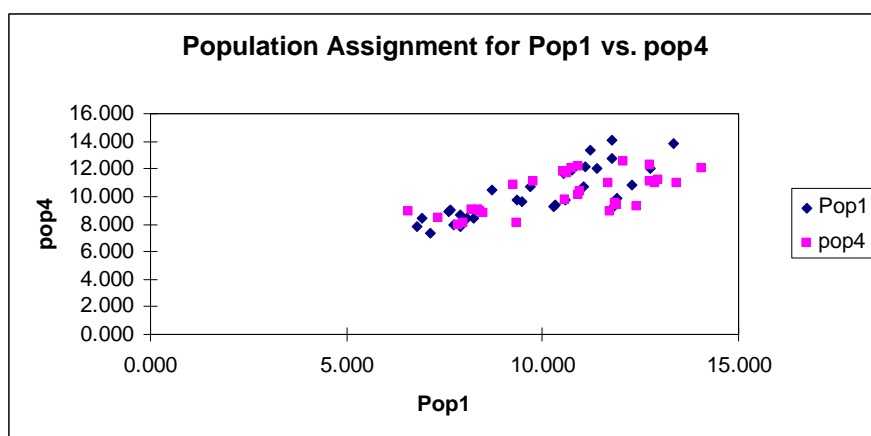
شکل سنجش ژنتیکی جمعیت ها بصورت جفت آورده شده است. این نقشه ها نمایشی از درجه تفکیک ژنتیکی جمعیت ها را میسر می سازند و روش مناسبی برای اندازه گیری اختلاف میان جمعیت ها به کمک نمودار و بر اساس تست های سنجش می باشند و اعداد نمایش داده شده روی محور بر حسب درجه تمایز است شکل ۹-۱۳ سنجش ژنتیکی جمعیت ها بصورت جفت آورده را نشان می دهد.



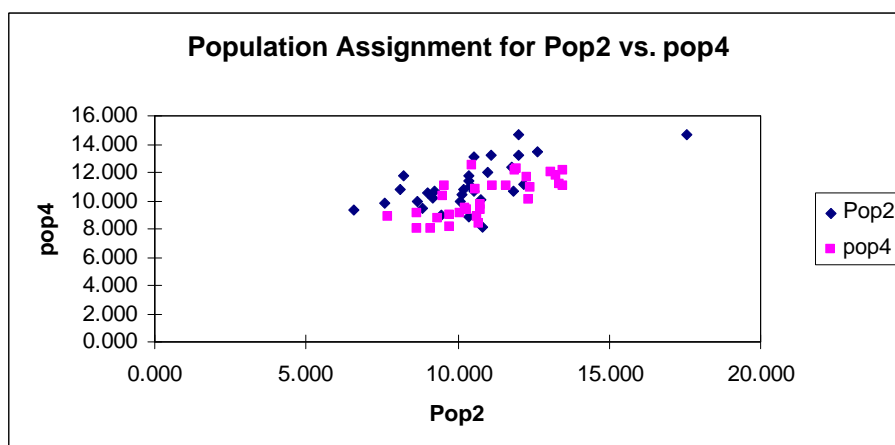
شکل ۹- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی جمعیت های نواحی تجن و شیرود بر حسب درجه تمایز در ۸ لوکوس میکروستلایت پلی مورفیک در ماهی سفید



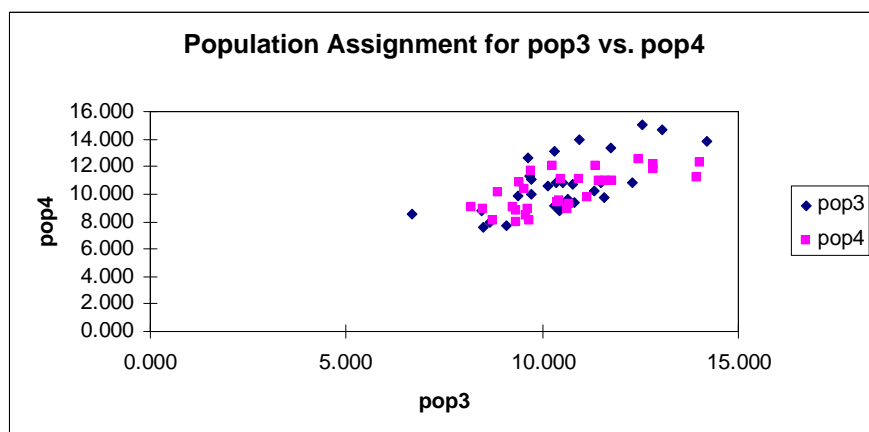
شکل ۱۰- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی جمعیت‌های نواحی تجن و سفیدرود بر حسب درجه تمایز در ۸ لوکوس میکروستلایت پلی‌مورفیک در ماهی سفید



شکل ۱۱- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی جمعیت‌های نواحی تجن و لمیر بر حسب درجه تمایز در ۸ لوکوس میکروستلایت پلی‌مورفیک در ماهی سفید



شکل ۱۲- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی جمعیت‌های نواحی شیروود و لمیر بر حسب درجه تمایز در ۸ لوکوس میکروستلایت پلی‌مورفیک در ماهی سفید



شکل ۱۳- نمودار تعیین سنجش ژنتیکی جمعیت‌های نواحی سفیدرود و لمیر  
بر حسب درجه تمایز در ۸ لوکوس میکروستلایت پلی مورفیک در ماهی سفید

## ۳-۳- بحث

امروزه تنوع ژنتیکی بعنوان نشانگر وضعیت اکولوژیکی در مناطق، نواحی و قبایل متفاوت کاربرد داشته و ابزار منحصر بفرد و توانمندی جهت ارزیابی وضعیت و روند طولانی مدت جوامع زیستی (اعم از آبی و خشکی) می باشد.

در مطالعه حاضر بیشترین هتروزیگوسیتی در رودخانه های شیروود (۰/۹۷) و کمترین آن در رودخانه تجن (۰/۱۷) مشاهده شده است. ضمن اینکه هتروزیگوسیتی در کل مناطق بین ۰/۱۳ تا ۰/۹۸ برای جایگاه آلل های مختلف نوسان داشته است.

هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه ها دارد زیرا تامین کننده طیف وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی است. و بسیاری از خصوصیات مهم مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تاثیر قرار میدهد (Beardmore et al., 1997). سطح تنوع ژنتیکی در هر گونه نسبت به گونه دیگر و در جمعیت های مختلف یک گونه که در هر منطقه می باشد متفاوت است.

Beacham and Dempson (۱۹۹۷) در بررسی مایکروساتلایتی ساختار جمعیتی *Salmo salar* میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار را ۰/۶۹۱ و تعداد الل ۶ را عنوان کردند. Shaw و همکاران در سال (۱۹۹۹) در بررسی مایکروساتلایتی شک ماهی اطلس (*Clupea harengus*) تعداد الل در لوکوس های مورد را ۴۱-۱۸ عدد و سطح هتروزیگوسیتی را حدود ۰/۹۳-۰/۹ گزارش نمودند. همچنین O'Reilly و همکاران در سال (۲۰۰۰) در بررسی مایکروساتلایتی ساختار جمعیتی (*Dissostichus eleginoides*) سطح بالای از هتروزیگوسیتی (۰/۵۸-۱) را گزارش کردند. Dewoody و Advise در سال (۲۰۰۰) تنوع ژنتیکی را در ماهیان دریایی ۵/۷۹ با متوسط تعداد الل ۲۰/۶، در ماهیان آب شیرین ۰/۴۶ با متوسط تعداد الل ۷/۵ و ماهیان آنادراموس رقمی بینابین ماهیان دریایی و آب شیرین تنوع ۰/۶۸ و تعداد الل ۱۱/۳ را گزارش کردند. علاوه بر این بارتفی و همکاران در سال (۲۰۰۲) در آنالیز ژنتیکی دو گله مولد (*Cyprino carpio*) کپور معمولی در مجارستان، با استفاده از روش مایکروساتلایت تعداد متوسط الل را ۴ الل و هتروزیگوسیتی را ۰/۲۶ اعلام کردند. Heckel و همکاران (۲۰۰۲) تنوع ژنتیکی را در دو جمعیت آنادراموس و آب شیرین (*Gasterosteus aculeatus*) با استفاده از روش مایکروساتلایت بررسی



کردند و تعداد ۶-۲ ال در لوکوسهای مورد مطالعه و تنوع ژنی ۰/۷۶-۰/۵۲ را در جمعیت آب شیرین و تعداد ال ۱۴-۵ در لوکوسهای مورد مطالعه و تنوع ژنی ۰/۹۲-۰/۴۶ را در جمعیت آنادراموس مشاهده کردند. مشاهده میگردد که میزان هتروزایگوسیتی در این بررسی تقریباً مشابه با سایر مطالعات انجام شده بر روی ماهیان دریایی و همچنین ماهیان رود کوچ می باشد.

تعادل هاردی - واینبرگ از دیگر فاکتورهایی است که مورد بررسی قرار گرفته است.

چنانچه جمعیتی در ابتدا به حالت عدم تعادل باشد برای اینکه به حالت تعادل ژنتیکی در آید یک نسل آمیزش اتفاقی کفایت می کند و تا زمانی که شرایط هاردی - واینبرگ برقرار است، جمعیت در حال تعادل باقی خواهد ماند ( فراوانیهای گامتی یا زایگوتی آن تغییری نمی کند). وجود جمعیت بزرگ با آمیزش اتفاقی (drift)، عدم انتخاب (selection)، عدم مهاجرت (gene flow)، عدم وجود فشار جهش و میوز معمولی در برقراری حالت تعادل موثر می باشند. همانگونه که جدول مربوط به بررسی تعادل هادی - واینبرگ نشان می دهد به جز جایگاه ۳ در دیگر جایگاهها اختلاف مشاهده شده در بین نمونه ها معنی دار بوده است ( $P \leq 0.001$ ) و معنی آن این است که جمعیت از تعادل ژنتیکی خارج شده است.

Appleyard و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه ساختار ژنتیکی تن ماهی چشم درشت (*Thunnus obesus*) انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ در ۱۴/۰ جمعیتها به ازای کل جایگاهها مشاهده کرد و علت این عدم تعادل را احتمالاً مربوط به خطای نمونه گیری دانست

Birgite و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی جمعیت اردک ماهی (*Esox lucius*) انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ در ۱۰٪ جمعیتها به ازای کل جایگاهها مشاهده کرد ( $P \leq ۰/۰۵$ ,  $P \leq ۰/۰۱$ ). ایشان این انحراف از تعادل را به اندازه کوچک جمعیت ناشی از حوادث بعد از عصر یخبندان نسبت دادند.

Zhao و همکاران در سال (۲۰۰۵) در ارزیابی تنوع ژنتیکی (*Acipenser sinensis*) نیز انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ را به وجود الهای صفر (null) و تلاقی خویشاوندی (Inbreeding) نسبت دادند (Zhao et al., 2005).

Dahle و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی ترکیب ذخایر *Gadus morhua* انحراف در تعادل هاردی - واینبرگ را به علت افزایش هوموزایگوسیتی، آلل های نول، رانش ژنتیکی، انتخاب، مخلوط شدن و غیر کافی بودن نمونه ها می داند (Dahl et al., 2006).

در بررسی قاسمی (۲۰۰۷) انحراف از تعادل مشاهده شده در نمونه های ماهی سیم به وجود اللهای نول و آمیزش خوشاوندی مولدین (drift) در کارگاههای تکثیر نسبت داده شد.

کیوان شکوه و همکاران (۲۰۰۷) انحراف از تعادل مشاهده شده در جمعیت ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) را به وجود اللهای نول نسبت دادند.

Kitanishi و همکاران (۲۰۰۸) انحراف از تعادل مشاهده شده در مطالعه ساختار جمعیتی *Oncorhynchus masou* را به خطای نمونه برداری نسبت دادند.

Menezes و همکاران (۲۰۰۸) انحراف از تعادل مشاهده شده در جمعیت های *Katsuwonus pelamis* را به وجود اللهای نول و اشتباهات ال خوانی و بالا بودن هتروزیگوسیتی در لوکوسهای میکروساتلایتی نسبت دادند.

بنظرمی رسد عدم مشاهده تعادل هاردی – واینبرگ در این مطالعه مربوط به حضور آلهای نول، تلاقی جمعیت ها (بعلت تکثیر مصنوعی)، تعداد کم نمونه ها و مهاجرت ماهیان باشد.

ساختار ژنتیکی جمعیتها ممکن است به طور قابل ملاحظه ای بین گونه ها بسته به رانش (drift)، جریان ژنی (gene flow) تغییر کند.

بر اساس تعریفی که از جمعیت وجود دارد یک جمعیت گروهی از افراد هستند که درون خود آمیزش دارند و از نظر تولیدمثلی از گروههای دیگر همان گونه جدا هستند اما به علت فقدان جداسازی کامل بین جمعیتها (در اثر وجود تبادل ژنی بین جمعیتها) به عنوان گونه قلمداد نمیگردند. در حقیقت رفتارهای تولید مثلی از جمله بازگشت به زادگاه اصلی نوعی رفتار تولیدمثلی برای جدایی هر چه بیشتر یک نژاد یا جمعیت میباشد (صفری، ۱۳۸۵).

نکته مهم در میکروستلایت ها نرخ جهش بالا در لوکوس های میکروستلایت است و از الگوی جهش نیز نباید غفلت کرد. روش تغییر در میکروستلایت ها تعیین کننده وضعیت آماری است که می تواند منعکس کننده مهاجرت یا زمان انشعاب باشد. اگر الگوی جهش در میکروستلایت کاملاً شناخته شود امکان تعیین شاخص آماری برای تمایز فاصله آلی تابع مهاجرت یا زمان انشعاب بین جمعیت ها وجود دارد. مدلهای مختلفی برای جهش پیشنهاد شده است اما هیچ یک از مدل های ارائه شده به طور کامل مناسب برای لوکوس های میکروستلایت نیستند. در نتیجه هر دو روش برآورد مرسوم در تمایز ( $F_{st}$ ) و برآورد کننده تمایز مخصوص میکروستلایت ( $R_{st}$ ) به طور معمول در مطالعاتی که از مارکرهای میکروستلایت استفاده می گردد، گزارش

می‌شوند. زمانی که  $F_{st}$  بیشتر از ۰/۲۵ باشد نشان‌دهنده جدایی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشد. به هر حال دادن یک معنی بیولوژیکال به این داده‌ها سخت و گمراه کننده است. برای تفسیر  $F_{st}$  پیشنهاد شده است که مقدار بین صفر تا ۰/۰۵ نشان دهنده تمایز ژنتیکی پایین، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالاست و مقدار بالای ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالاست.

در این بررسی بیشترین مقدار  $F_{st}$  بین نمونه های رودخانه لمیر با سفیدرود (۰/۰۸) و کمترین مقدار بین نمونه های رودخانه سفیدرود با تجن (۰/۰۰۸) بوده است. علاوه بر این بیشترین مقدار  $R_{st}$  بین نمونه های رودخانه شیرو و سفیدرود (۰/۳۴) و کمترین آن بین نمونه های رودخانه سفیدرود با تجن (۰/۰۰۱) مشاهده شده است.

Shaw و همکاران در سال (۱۹۹۹) در مطالعه شک ماهی اطلس (*Clupea harengus*) میزان  $F_{st}$  میان جمعیتها را ۱ الی ۳ درصد تخمین زدند که این میزان اختلاف مشاهده شده بین جمعیتها را نشان نمی داد بنابراین از شاخص دیگری بنام  $R_{st}$  استفاده کردند که میزان آن ۲ الی ۲۷ درصد بود و عدم معنی دار بودن اختلاف بین جمعیت هرینگهای بهار تخم ریز نروژ و هرینگهای بالسفجورد را ناشی از مهاجرت برای تغذیه این ماهیان دانستند.

Adams و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی ساختار brook charr (*Salvelinus fontinalis*) میزان  $R_{st}$  را ۰/۰۵۲ تا ۰/۰۰۱ ( $P \leq$ ) تعیین و اعلام کردند که علی رغم وجود سد فیزیکی برای مهاجرت بین دریاچه های حوزه آبریز خلیج هند هر دریاچه جمعیت تولید مثلی مجزایی دارد که این را به شرایط هیدرو جغرافیایی نه به فاصله جغرافیایی نسبت دادند.

Appleyard و همکاران (۲۰۰۲) میزان  $F_{st}$  در لوکوسهای مورد مطالعه را ۰-۰/۰۱ بطور متوسط ۰/۰۰۲ تخمین زده و نتوانستند فرضیه یک نوع وهم شکل بودن (Panmictic) جمعیت تن ماهی چشم درشت (*Thunnus obesus*) را در اقیانوس هند رد کنند. Beacham و همکاران (۲۰۰۲) در تعیین جمعیتی افراد (*Oncorhynchus nerka*) Sokey میزان  $F_{st}$  را ۰/۰۶ تخمین زدند و ۸۹٪ از افراد مورد بررسی در دریاچه ها به یک دریاچه و ۹۶٪ افراد مورد بررسی در رودخانه ها به یکی از دو رودخانه تعلق داشتند.

Herwerden و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی تنوع مایکروساتلایتی و ساختار ژنتیکی جمعیت ماهی دهان قرمز (*Lethrinus miniatus*) در مناطق صخره ای Great barrier در ۶ مکان نمونه برداری از سه ناحیه جغرافیایی تنوع ژنتیکی داخل مکانها ۹۹/۷۴٪ ( $P \leq ۰/۰۲۳$ )، بین مکانها ۱۵٪ ( $P \leq ۰/۱۷۶$ )، میان نواحی ۰/۱٪ ( $P \leq ۰/۰۲۲۴۷$ ) برآورد نمود که بین نمونه های داخل هر مکان اختلاف معنی دار بین مکانها و میان نواحی اختلاف معنی دار نبود.

و ماهی دهان قرمز به عنوان یک ذخیره ژنتیکی مشخص در Great barrier وجود داشته است و مهاجرت بین نواحی نمونه برداری وجود دارد. نتایج ایشان مشابه نتایج این بررسی می باشد. به دلیل اینکه فراوانی هر هاپلو تیپ در بررسی حاضر یک است لذا در تست AMOVA بیشترین تنوع مربوط بین افراد به دست آمده است.

نوروزی (۱۳۸۶) با استفاده از روش مایکروستلایت در مطالعه جمعیت های ازون برون دامنه  $F_{st}$  را ۰/۰۲۸ تا ۰/۰۶۳ و دامنه  $R_{st}$  با احتمال ۹۹ درصد ۰/۰۴۱ تا ۰/۴۳۹ اعلام کرد. قاسمی (۲۰۰۷) ماهی سیم آذربایجان و ایران را از هم جدا نمودند. در بررسی ریحانی (۱۳۸۷) میزان  $F_{st}$  بین نمونه های کلمه ایران و آذربایجان را ۰/۰۶۴ تخمین زدند. در بررسی سالاری (۱۳۸۷) سه جمعیت مستقل ماهی سوکلا (جمعیت ماهی سوکلای ناحیه بوشهر، بندر عباس و چابهار) در میان نمونه های مورد بررسی نشان داد

در بررسی حاضر بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به نمونه های رودخانه شیروود با تجن (۰/۰۷) و کمترین فاصله بین نمونه های سفیدرود با تجن بوده است. ضمن اینکه بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه های رودخانه تجن با سفیدرود و کمترین شباهت بین رودخانه شیروود با تجن بوده است.

#### ۴- نتیجه گیری نهایی

با توجه به ارزیابی مقادیر به دست آمده از فراوانی آللی، هتروزیگوسیتی و تعادل هاردی-واینبرگ ماهی سفید دریای خزر در نواحی مختلف نمونه برداری در سواحل جنوبی دریای خزر بیش از یک جمعیت ماهی سفید وجود دارد. با توجه به انطباق نتایج حاصله با پیش فرض های معلوم می توان جمع بندی کرد که نشانگرهای ریز ماهواره ای ابزار بسیار توانمندی برای بررسی تنوع درون و بین جمعیتی و روابط تکاملی میان جمعیت ها و بطور کلی مطالعات ژنتیک جمعیتی می باشند. علی رغم تخریب زیستگاه، آلودگی های شدید زیست محیطی و عدم تکثیر طبیعی ماهی سفید در خزر هنوز تنوع ژنتیکی در این ماهی وجود دارد و برای حفظ این تنوع باید برنامه ریزی لازم صورت پذیرد.

## پیشنهادهای

### پیشنهادهای اجرایی

بر اساس نتایج به دست آمده بیش از یک جمعیت در سواحل جنوبی دریای خزر وجود دارد که باید هنگام تکثیر مصنوعی در نظر گرفته شود و از جابجایی ماهیان مولد صید شده به منظور تکثیر مصنوعی و تخم لقاح یافته به سایر مناطق خودداری شود. به منظور افزایش تنوع و حفاظت ژنتیکی این گونه در کارگاههای تکثیر مصنوعی از بیشترین تعداد مولد استفاده شود. بچه ماهیان حاصله از هر رودخانه به همان رودخانه رهاسازی شود و حداقل از جابجایی بین استانها خودداری شود.

### پیشنهادهای پژوهشی

از آنجائیکه تا کنون پرایمرهای اختصاصی ریزماهواره این گونه کلون و شناسائی نشده است پیشنهاد میگردد پرایمرهای اختصاصی این گونه مورد مطالعه و طراحی قرار گیرد. در مطالعات آتی ژنتیک جمعیت از تعداد پرایمر اختصاصی و نمونه بیشتری استفاده گردد.

## منابع

1. Abdolmaleki, S. H. & Ghaninezhad, D. (2007). Stock assesment of the Caspian sea in kutum (*Rutilus frisii kutum*) Iranian coastal water of Caspian Sea. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 16(1), 103-114.
2. Adams, B. K. & Hutchings, J. A. (2003). Microgeographic population structure of brook charr: a comparison of microsatellite and mark-recapture data. *Journal of Fish biology*, 62(3), 517-533.
3. Alam, M. S. & Islam, M. S. (2005). Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 246(1-4), 151-160.
4. Angers, B., Bernatchez, L., Angers, A. & Desgroseillers, L. (1995). Specific microsatellite loci for brook charr reveal strong population subdivision on a microgeographic scale. *Journal of Fish Biology*, 47(sA), 177-185.
5. Appleyard, S. A., Ward, R. D. & Grewe, P. M. (2002). Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian Ocean using mitochondrial DNA and microsatellites. *Journal of Fish Biology*, 60(3), 767-770.
6. Ataee, F. (2002). *Genetic diversity and morphometric of A.persicus in Sefidrood River with PCR-RFLP in south of the Caspian Sea*. Melei University. 157pp.
7. Bartfai, R., Egedi, S., Yue, G. H., Kovacs, B., Urbanyi, B., Tamas, G., Horvath, L. & Orban, L. (2003). Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, 219(1-4), 157-167.
8. Beacham, T. D. & Dempson, J. B. (1997). Population structure of Atlantic salamon from the conne River ,Newfounland as determined from microsatellite DNA. *Journal of Fish Biology*.. 52, 665-676.
9. Beacham, T. D., Mcintosh, B. & Macconnachie, C. (2002). Microsatellite identification of individual sockeye salmon in Barkley Sound ,British Colombia .. *Journal of Fish Biology*.. 61, 1021-1032.
10. Chakmehdouz Ghasemi, F., Pourkazemi, M., Zamini, A., Yarmohamadi, M., Baradaran Noveri, S., hasanzadeh saber, M. & Rezvani Gilkolaei, S. (2009). Genetic analysis of spring and atumn races of Caspian Sea kutum (*Rutilus frisii kutum*) using microsatellite markers. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*., 5(1), 1-8.
11. Chow, S., Okomao, H., N, M., Hiramatusu, K. & Barut, N. (2000). Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pasific stock of big eye tuna(*Tunna abesus*)and admixture around South African. *Molecular Ecology*, 9, 221-227.
12. Coad, B. W. (2000). Criteria for assessing the conservation status of taxa (as applied to Iranian freshwater fishes) *Biologia, Bratislava*, 55(5), 539-557.
13. Dahl, J., Pettersson, E., Dannewitz, J., Jarvi, T. & Lof, A. C. (2006). No difference in survival, growth and morphology between offspring of wild-born, hatchery and hybrid brown trout (*Salmo trutta*). . *Ecology of Freshwater Fish* 15, 388-397.
14. Dewoody, J. A. & Avise, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadramous fishes compared with other animals. . *Journal of Fish Biology*.. , 56, 461-473.
15. Ferguson, M. M. (1995). *The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes*. In: *Molecular genetics in fisheries*. G. R. Carvalho and T. J. Pitcher (Eds). Chapman & Hall Inc. London.
16. Gross, R., Kohlmann, K. & Kersten, P. (2002). PCR-RFLP analysis of the mitochondrial ND-3/4 and ND-5/6 gene polymorphisms in the European and East Asian subspecies of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 204(3-4), 507-516.
17. Hansen, M. (2004). *Application Of Molcular Markers In Population and Conservation Genetics, With Special Emphasis On Fishes*. . University of Aarhus.
18. Hansen, M. M., Nielsen, E. E., Ruzzante, D. E., Bouza, C. & Mensberg, K. L. D. (2000). Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (*Salmo trutta* L.) using microsatellite DNA markers. *Can. , J. Fish. Aquat. Sci.*, 57, 2130- 2139.
19. Heckel, G., Zbinden, M., Mazzi, D., Kohler, A., Reckeweg, G., Bakker, T. C. M. & Largiader, C. (2002). Microsatellite markers for the three-spined stickelback(*Gasterosteus aculeatus* L.) and their applicability in a freshwater and anadramous population. *Conservation Genetics*., 3, 79-81.
20. Herwerden, L. V., Benzie, J. & Davies, C. (2003). Microsatellite variation and population genetic structure of the red throat emperor on the Great Barrier Reef. *Journal of Fish Biology*, 62(5), 987-999.
21. Innocentiis, S., Miggianno, E., Ungaro, A., Livi, S., Sola, L. & Crosetti, D. (2005). Geographical origin of indavidual breeders from gilthead sea bream (*Sparus auratus*) hatchery broodstocks inferred by microsa4elllte profiles. *Aquaculture*, 247(1-4), 227-232.
22. Keyvanshokooh, S., Ghasemi, A., Shahriari-Moghadam, M., Nazari, R. M. & Rahimpour, M. (2007). Genetic analysis of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran by microsatellite markers. *Aquaculture Research*., 38, 953-956.
23. Khara, H., Keyvan, A., Vosughi, G., Pourkazemi, M., Rezvani, S. & Nezami, A. (2007). Comparison of morphometric & meristic attributes of bream (*Abramis brama*) in Caspian Sea and Aras Dam. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 15(4), 33-48.

24. Kitada, S. & Kishino, H. (2006). Lessons learned from Japanese marine finfish stock enhancement programmes. *Fisheries Research*, 80(1), 101-112.
25. Kitanishi, S., Edo, K., Yamamoto, T., Azuma, N., Hasegawa, O. & Higashi, S. (2007). Genetic structure of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) populations in Hokkaido, northernmost Japan, inferred from mitochondrial DNA variation. *Journal of Fish biology*, 71(sc), 437-452.
26. Krieg, F., Trintafyllidis, A. & Guyomard, R. (2000). Mitochondria DNA variation in European population of *Silurus glanis*. *Journal of Fish Biology*, 56, 713-724.
27. Li, X., Field, C. & Doyle, R. (2003). Estimation of Additive Genetic Variance Components in Aquaculture Populations Selectively Pedigreed by DNA Fingerprinting. *Biometrical Journal*, 45(1), 61-72.
28. Lucentini, L., Palomba, A., Lancioni, H., Gigliarelli, L., Natali, M. & Panara, F. (2006). Microsatellite polymorphism in Italian populations of northern pike (*Esox lucius* L.). *Fisheries Research*, 80(2-3), 251-262.
29. Menezes, M. R., Noguchi, D., Nakajima, M. & Taniguchi, N. (2008). Microsatellite development and survey of genetic variation in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Journal of Fish Biology*, 73(2), 463-473.
30. Messier, W., Li, D. & Stewart, C. (1996). The birth of microsatellite. *Nature* 3, 81,483.
31. Myers, R. M., Lumelsky, N., Lerman, L. S. & Maniatis, T. (1987). Detection of single base substitution in total genomic DNA *Nature*, 313(6002), 495-498.
32. Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. . *Am. Nat.*, 106, 283-292.
33. Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
34. O'Reilly, P. & Wright, J. M. (1995). The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.*, 47,(Suppl. A), 29-55,.
35. Phillips, R. B. & Reed, K. M. (1996). Application of flurescence in situ hybridization(Fish) techniques to fish genetics: areview. . *Aquaculture*, 140, 197-216.
36. Pourkazemi, M. (1996). *Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea.*, University of Wales 260pp.
37. Rayman, N. (1981). Fish gene pools. Ecological Bulletins 34, Stockholm: Editorial Service,FRN.
38. Rezvani Gilkolaei, S. (1997). *Molecular population genetics studies of sturgeon species in the south Caspian Sea.* University of Wales, Swansea.
39. Rezvani Gilkolaei, S. (2000). Study of mtDNA variation of Russian sturgeon population from the South Caspian Sea using RFLP analysis of PCR amplified ND5/6 gene regions. *IranianJournal of Fisheries Sciences*, 2, 13-36.
40. Rezvani Gilkolahi, S., Eimanifar, A., Aghili, R. & Laloei, F. (2006). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of *Rutilus rutilus caspicus* populations on the southern coast of the Caspian Sea, Iran.. *J. Mar. Biol*, 86, 1463-1467.
41. Rico, C., Ibrahim, K. M., Rico, I. & Hewitt, G. M. (1997). Stock composition in North Atlantic population of whiting using microsatellite markers. *Journal of Fish Biology.*, 51, 462-475.
42. Ryman, N. (1991). Conservation genetics considerations in fishery management. *Journal of Fish Biology*, 39(sA), 211-224.
43. Salgueiro, P., Carvalho, G., Collares-Pereira, M. J. & Coelho, M. M. (2003). Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaocypris hispanica* in Portugal: implications for conservation. *Biological Conservation*, 109(1), 47-56.
44. Shabani, A. (2005). *Comparison of A.stellatus population of south and north of Caspian Sea by PCR-RFLP*
45. University of Gorgan, Gorgan.
46. Shaw, P. W., Turan, C., Wright, J. M., O'connell, M. & Carvalho, G. R. (1999). Microsatellite DNAanalysis of population structure in Atlantic herring(*Clupea harengus*),with direct comparsion to allozyme and mtDNA RFLP analysis.. *Heredity* 83, 490-499.
47. Skaala, O., Hoyheim, B., Glover, K. & Dahle, G. (2004). Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals. *Aquaculture*, 240(1-4), 131-143.
48. Smith, P. & Mcveagh, M. (2005). Allozyme and microsatellite DNA markers of tothfish population structure in the Siuthern Ocean *Journal of Fish Biology*, 57, 72-83.
49. Smith, T., Nelson, J., Polard, S., Rubidge, E., Mckay, S. J., Rodzen, J., May, B. & B., K. (2002). Population genetic analysis of sturgeon (*Acipenser transmontanus*)in the Fraser river. *J.Appl.Ichthyo.*, 18, 307-312.
50. Sunsik, S.,Snoj, A.,Dovc, P. (1999). Microsatellite in gayling (*Thymalus thymalus*):comparsion of two geographically remote population from the Danubian and Adriatic river basin in Slovenia. *Molcular Ecology* ,8:1756-1758.
51. Thai, B. T., Burrige, C. P. & Austin, C. M. (2007). Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellite loci. *Aquaculture*, 269(1-4), 174-186.
52. Thorpe, J. P. & Sol-Cave, A. M. (1994). The use of allozyme electrophoresis in vertebrate systematics. *Zoologica Scripta*, 23, 3-18.



53. Triantafyllidis, A., Krieg, F., Cottin, C. & Abatzapoulos, T. J. (2002). Genetic structure and phylogeography of European catfish (*Silurus glanis*) populations. . *Molecular Ecology*, 11, 1039-1055.
54. Utter, F. (2004). Population genetics, conservation and evolution in salmonids and other widely Cultured fishes: some perspectives over six decades. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14, 125-144.
55. Utter, F. M. (1991). Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. *Journal of Fish Biology*, 39(sA), 1-20.
56. Vrijenhoek, R. C. (1998). Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 53(sA), 394-412.
57. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18, 6531-6535.
58. Wirgin, I., Waldman, J., Stabile, J., Lubinski, B. & King, T. (2002). Comparison of mitochondrial DNA control region sequence and microsatellite DNA analysis in estimating population structure and gene flow rates in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) *J. Appl. Ichthyol.*, 18, 313-319.
59. Zhao, N., Shao, Z., Ai, W., Zhu, B., Brosse, S. & Chang, J. (2005). Microsatellite assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability. *J. Appl. Ichthyol.*, 21, 7-13.

۶۰. بنابازی، م. (۱۳۸۱). بررسی تنوع ژنتیکی در درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۶۱. دانشور املی، ع. ر. ۱۳۸۳. بررسی پلی مورفیسم تعدادی از مارکرهای مایکروساتلایتی در جمعیت گوسفند بلوچی، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، گرایش ژنتیک و دام، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، ۱۰۰ ص.

۶۲. جوانروح علی آباد، ع. ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی شش توده بز بومی ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ۷۴ ص.

۶۳. خارا، ح. ۱۳۸۳. بررسی وجود تنوع مورفومتریکی، مریستیک و ژنتیک مولکولی درون گونه ای ماهی سیم (*Abramis brama orientalis*) در تالاب انزلی، سواحل جنوبی دریای خزر، دریاچه سد ارس و جمهوری آذربایجان، پایان نامه دکتری شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۲۳۰ ص.

۶۴. رضوانی، س. (۱۳۸۰). . . بررسی مولکولی جمعیت میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* در دریای عمان و خلیج فارس با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) I بروش RFLP مجله علمی شیلات ایران (فارسی)، سال دهم (شماره ۲).

۶۵. رضوانی، س. (۱۳۸۰). معرفی نشانگرهای ژنتیکی برای شناسایی و جداسازی سه گونه اقتصادی میگوی خلیج فارس و دریای عمان (*indicus*, *P. merguensis*, *P. semisulcatus*) مجله علمی شیلات ایران (فارسی)، سال دهم (شماره ۴).

۶۶. رضوی صیاد ، ب.، ۱۳۷۲. تعیین نژادهای ماهی سفید با استفاده از الکتروفوروز پروتئین های سرم، خوندانشگاه آزاد اسلامی تهران ، ۱۱۵ ص .
۶۷. رضوی صیاد، ب.، ۱۳۶۷، زندگی ماهی سفید. سازمان شیلات ایران-انزلی
۶۸. رضوی صیاد ، ب.، ۱۳۷۸. مقدمه‌ای بر اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران .
۶۹. ریحانی، س. (۱۳۸۷). بررسی تنوع ژنتیکی ماهی کلمه سواحل ایران و روسیه با استفاده از روش میکروساتلایت . پایان نامه بیولوژی دریا دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات.
۷۰. صفری، ر. (۱۳۸۵). بررسی ساختار جمعیتی ماهی شپ در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش مایکروساتلایت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگا.
۷۱. عبدالحی، ح. (۱۳۷۷). تولید بچه ماهی برای رهسازی در دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ۱۲، ۳۰-۲۰.
۷۲. عبدالحی، ح.، هادی، ب. ط. & رضا، ا. (۱۳۸۴). بیوتکنیک مراکز تکثیر ماهیان خاویاری در سالهای ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۱ مجله علمی شیلات ایران (فارسی)، (۱۴ ۴)، ۹۷-۱۱.
۷۳. عبدالملکی، ش. (۱۳۸۳). ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر در سال ۸۴-۸۳. بندر انزلی: کشور پژوهشکده آبرزی پروری (o. Document Number)
۷۴. عطائی، ف. (۱۳۸۱). بررسی تنوع ژنتیکی تاس ماهی ایران در رودخانه سفیدرود با استفاده از روش مولکول PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعات مورفولوژیکی... دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی.
۷۵. غنی نژاد، د. (۱۳۸۴). ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر در سال ۱۳۸۳-۱۳۸۲ تحقیقات شیلات ایران.
۷۶. قاسمی، الف.، ۱۳۸۲. مقایسه تنوع ژنتیکی ماهی شپ (*Acipenser nudiventris*) در سواحل جنوبی دریای خزر و رودخانه اورال با استفاده از روش PCR-RFLP، پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا ، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، ۷۴ ص.
۷۷. قلی اف، ذ. م.، ۱۹۹۷. کپورماهیان و سوف ماهیان حوزه جنوبی و میانی دریای خزر (ساختار جمعیتها، اکولوژی، پراکنش و تابیری جهت بازسازی ذخایر)، ترجمه یونس عادل، مرکز تحقیقات شیلاتی استان گیلان ، بندر انزلی، ۴۴ ص.

۷۸. لالویی، ف. (۱۳۷۹). بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Barbus capito* در استانهای گیلان و مازندران. پایان نامه. . . دانشگاه تربیت مدرس.

۷۹. لالویی، ف، رضوانی، س & پورکاظمی، م. (۱۳۸۲). . بررسی مولکولی تنوع ژنتیکی ماهی (*Barbus capito*) در آبهای حوضه جنوبی دریای خزر بروش PCR-RFLP مجله علمی شیلات ایران (فارسی)، بهار، ۱۳۰-۱۱۷.

۸۰. نوروزی، م. ۱۳۸۶. بررسی ساختار جمعیت های ماهی اوزون برون در یای خزر با استفاده از روش مولکولی میکروستلایت. پایان نامه دکتری بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۱۶۹ ص.

## Abstract

Study of Mahisefid population using mtDNA with PCR

Mahisefid diversity was studied in four rivers including Lamir, Sefidrood, Shirrood and Tajan. Total sample was collected from four rivers when fish migrate to river for spawning, 100 samples from Sefidrood, 98 samples from Lamir, 48 samples from Shirrood and 48 samples from Tajan. DNA was extracted with phenol-chloroform.

Samples were used for RFLP, the PCR product were digested by 20 restriction enzymes as follow: *TasI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HincII*, *SalI*, *DraI*, *AccI*, *AvaII*, *XbaI*, *BshNI*, *AvaI*, *BclI*, *BshII*, *MspI*, *PstI*, *RsaI*, *SdnI*, *TaqI*, *TruI*, *VspI*. The four restriction enzymes including: *TasI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HincII* showed diversity, 6 enzyme didn't have any restriction and 14 enzyme showed monomorphic. Total 20 haplotype studied that haplotype AAAA and BAAA had most frequency. The average haplotype frequency of AAAA was 29.93% and the average haplotype frequency of BAAA was 27.55%.

2- Study of population of Mahisefid with microsatellite markers

120 specimens of *R. frissi kutum* were used from four rivers to test thirty primers (30 samples from each river) of which 8 primers showed polymorphism. A large variation in heterozygosity average over all samples was observed among loci, that ranged from 0.13 to 0.91. For a given locus, observed heterozygosity varied greatly among the samples. For example, in Lamir 0.07 at SPY5 and 1 in Sefid Rud at CA1. Tajan had an observed heterozygosity of only 0.17, whilst the Lamir had an observed heterozygosity of 0.07 at locus SPY5. At locus SPY4, Tajan and Sefid Rud are the same and (0.53) and Shir Rud is 0.83 and Lamir is 0.47. However, despite these differences, there was clear difference in average heterozygosity observed between the samples. To investigate Hardy-Weinberg Equilibrium in all loci and all rivers deviate showed from Hardy-Weinberg Equilibrium was significantly different ( $P < 0.01$ ) except in SPY6 locus.

The maximum average  $H_o$  was 0.91 in locus CA1 and minimum was 0.13 in locus SYP5 and maximum average of  $H_e$  was 0.89 in locus SYP4 and minimum was 0.28 in locus SYP6. Highest  $H_o$  was 1 in locus CA1 in Sefid Rud River and lowest was 0.07 in locus SYP5 in Lamir River, highest  $H_e$  was 0.92 in locus SYP4 in Shir Rud River and lowest was 0.24 in locus SYP6 in Tajan River. According to Nei (1978) the highest genetic distance was between Shir Rud River and Tajan River (0.07) and lowest genetic distance was between Sefid Rud River and Tajan River (0.05). The highest genetic similarity was between Sefid Rud River and Tajan River (0.95) and the lowest genetic similarity was between Shir Rud River and Tajan River (0.93).  $F_{ST}$  was significantly different ( $P > 0.05$ ) between all samples except Lamir River and Sefid Rud River.

The highest  $F_{is}$  was in Lamir River (0.84) in locus SPY5 and in Sefid Rud River in locus SPY5 (0.71), in locus CA12 (0.67) in Shir Rud River and SPY5 (0.63) in Tajan River. The lowest  $F_{is}$  is in locus CA1 (-0.55) in Sefid Rud River, in locus CA1 (-0.47) in Tajan River, in locus CA1 (-0.28) in Lamir River and in locus SPY6 (0.16) in Shir Rud River.

**Ministry of Jihad – e – Agriculture**  
**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION**  
**IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION**

---

**Title :** Study of Kutum *Rutilus frisii kutum* population using mtDNA with PCR

**Apprpved Number:** 4-019-200000-03-85016

**Author:** Hossein Ali Abdolhay

**Executor :** Hossein Ali Abdolhay

**Collaborator(s) :** F. Laloei; M. J. Taghavi; M. Hassanzadeh Saber; M. Neirani

**Location of execution :** Tehran province

**Date of Beginning :** 2006

**Period of execution :** 3 years

**Publisher :** *Iranian Fisheries Research Organization*

**Circulation :** 20

**Date of publishing :** 2011

**All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted  
without indicating the Original Reference**

**MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE**  
**AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION**  
**IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION**

**Title:**

**Study of Kutum (*Rutilus frisii kutum*) population using  
mtDNA with PCR**

**Executor :**

**Hossein Ali Abdolhay**

**Registration Number**

**2010.932**